

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hautkrankheiten
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl
Klinik für Andrologie und Venerologie
Leiter: Prof. Dr. W. Krause

des Fachbereiches Medizin der Philipps- Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg



Flowzytometrische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen im menschlichen Ejakulat

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Alexandra Güth
aus Hadamar

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps- Universität Marburg am 13.10.2005
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. W. Krause
Korreferent: PD Dr. T. Zeiler

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Leukozytensubpopulationen	1
1.1.1 Granulozyten	1
1.1.1.1 Neutrophile Granulozyten	1
1.1.1.2 Eosinophile Granulozyten	3
1.1.1.2 Basophile Granulozyten	4
1.1.2 Monozyten	5
1.1.3 Lymphozyten	7
1.1.3.1 B- Lymphozyten	8
1.1.3.2 T- Lymphozyten	9
1.1.3.3 Natürliche Killerzellen	11
1.2 Flowzytometrie	12
1.3 Leukozyten im Ejakulat	15
1.3.1 Labordiagnostik	15
1.3.2 Vergleich der Leukozytenverteilung im Blut/ Ejakulat	16
1.3.3 Ursprung der seminalen Leukozyten	17
1.3.4 Leukozytospemie	18
1.3.4.1 Definition	18
1.3.4.2 Leukozytospemie und männliche Infertilität	20
1.3.4.3 Therapie der Leukozytospemie	22
1.3.5 ROS	22
1.4 Antigene Strukturen	25
1.5 Fragestellung	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Untersuchungsgut	33
2.1.1 Ejakulat	33
2.1.2 Blut	33
2.2 Antikörper	34
2.3 Aufarbeitung der Ejakulate	34
2.3.1 Vorversuch A	34
2.3.2 Vorversuch B	35

2.3.3	Antikörperfärbung mit CD69/ CD71 als Aktivitätsnachweis	36
2.3.4	Versuchsreihe	36
2.3.4.1	Blut	36
2.3.4.2	Ejakulat	36
2.4	Flowzytometrische Auswertung	37
2.5	Mikroskopische Kontrolle	39
2.6	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Vorversuch A	40
3.2	Vorversuch B	41
3.3	CD69/ CD71 als Aktivitätsnachweis	42
3.4	Versuchsreihe	42
3.4.1	CD45/ CD53	42
3.4.2	CD13	44
3.4.3	CD15	46
3.4.4	CD14	48
3.4.5	CD19	50
3.4.6	CD22	52
3.4.7	CD3	55
3.4.8	CD16/ CD56	57
3.5	Mikroskopische Kontrolle	57
4	Diskussion	59
4.1	Aufarbeitung der Ejakulate	59
4.2	Leukozytenverteilung im Ejakulat	60
4.3	Weitere partikuläre Ejakulatbestandteile	63
4.4	Färbung durch Aktivierungsmarker	67
4.5	Versuchsreihe	69
4.5.1	Pan- Leukozytenfärbungen	69
4.5.2	Granulozytenfärbungen	71
4.5.3	Monozytenfärbungen	74

4.5.4	Lymphozytenfärbungen	78
4.5.4.1	B- Lymphozyten	78
4.5.4.2	T- Lymphozyten	79
4.5.4.3	Natürliche Killerzellen	80

5	Zusammenfassung	83
----------	------------------------	----

	Literaturverzeichnis	85
--	-----------------------------	----

	Abkürzungen	94
--	--------------------	----

	Lebenslauf	95
--	-------------------	----

	Verzeichnis der akademischen Lehrer	96
--	--	----

	Danksagung	97
--	-------------------	----

1. EINLEITUNG

1.1 Leukozytensubpopulationen

1.1.1 Granulozyten

Granulozyten sind mit 60-70% die im Blut am häufigsten vorkommende Leukozytensubpopulation. Als Charakteristika für reife Granulozyten gelten der gelappte Zellkern und die zahlreichen Granula im Zytoplasma. Entsprechend der histologischen Anfärbbarkeit dieser Granula werden die Granulozyten in neutrophile (90%) eosinophile (2-4%) und basophile (1%) unterteilt (Pschyrembel, 1994). Alle Granulozyten werden der unspezifischen Abwehr zugeteilt und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose.

1.1.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden wie alle Granulozyten im Knochenmark produziert. Der Pool neutrophiler Granulozyten, der dort gespeichert ist, ist 20 mal größer als die Zahl der im Blut zirkulierenden Neutrophilen. Sie werden zwei Tage nach Vollendung ihrer Reifung vom Knochenmark ins Blut abgegeben, bei Entzündungen auch schon früher (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).



Neutrophile Granulozyten sind 10-15µm große Zellen, die zwei Gruppen von Granula besitzen. Die azurophilen Granula ähneln den Lysosomen anderer Zelltypen. Sie enthalten unter anderem saure Hydrolasen wie Kathepsin B und D, Myeloperoxidase,

Abb. 1.1: Neutrophiler Granulozyt
(aus Janeway C.A. et al., 2002)

Serinproteinasen, Defensine und Lysozym. In den spezifischen Granula findet man ebenfalls Lysozym sowie Lactoferrin, Kollagenasen und Gelatinasen. Zur Unterscheidung der Granula, die nicht immer ganz einfach ist, dienen Myeloperoxidase und Lactoferrin als Markerenzyme.

Die Lebensdauer reifer neutrophiler Granulozyten ist beschränkt und mit 1-2 Tagen sehr kurz, da sie nur in geringem Maße fähig sind, Proteine neu zu synthetisieren (Gemsä D. et al., 1997).

Neutrophile Granulozyten werden bereits von geringen chemotaktischen Stimuli wie z.B. C5a, IL-8, Leukotrien B4 angelockt, die im Falle einer Entzündung oder Gewebsschädigung gebildet werden. Beim Verlassen des Blutkreislaufs kommt es zunächst zu einer Verlangsamung im Blutstrom und Margination der Zellen durch reversible Interaktion zwischen fucosylierten Oligosacchariden (Janeway C.A. et al., 2002) der Granulozytenoberflächen und Selektinmolekülen der Endothelzellen. Die Adhäsion wird dann durch zusätzliche Moleküle stabilisiert, bevor die Granulozyten zwischen den Endothelzellen hindurch ins Gewebe gelangen (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).

Neutrophile Granulozyten findet man rasch und in großer Zahl am Entzündungsort. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten einer Vielzahl von Mikroorganismen. Daneben bauen sie alternde Zellen ab. Opsonierung der Keime durch IgG und die Komplementkomponente C3b erleichtert die Phagozytose, da Granulozyten auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für diese Opsonine tragen. Die Bindung opsonierter Partikel hat zum einen die Entstehung reaktiver Sauerstoffprodukte zur Folge, die die Keime in den Phagosomen abtöten. NADPH- Oxidase befindet sich in der Plasmamembran und bildet Superoxid (O_2^-), welches spontan zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) reagiert. H_2O_2 kann sich – durch die Myeloperoxidase der azurophilen Granula katalysiert – mit Chloridionen zu HOCL verbinden, das an sich bereits sehr toxisch für Mikroorganismen ist, aber auch die Möglichkeit besitzt, mit Aminen zu einer stabileren toxischen Substanz, dem N- Chloramin, zu reagieren (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Zum anderen setzt die Anheftung der Mikroorganismen an den IgG Rezeptor den Phospholipidmechanismus in Gang, wobei Arachidonsäure-Metabolite wie Prostaglandine und Leukotriene gebildet werden. Diese sind zusammen mit weiteren von den neutrophilen Granulozyten freigesetzten Mediatoren für die Auslösung der Entzündungszeichen verantwortlich (Gemsä D. et al., 1997). Eine durch die Phagozytose des Mikroorganismus hervorgerufene Änderung der intrazytoplasmatischen Calcium- Konzentration bewirkt eine Fusion der Granula mit dem Phagosom oder eine extrazelluläre Freisetzung der

Inhaltsstoffe. Auf diese Weise werden die durch HOCL und N- Chloramin abgetöteten Organismen verdaut.

Unerwünschter Nebeneffekt ist die Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes durch die toxischen Sauerstoffprodukte und Verdauungsenzyme.

Eine zu große Menge aufgenommenen Fremdmaterials kann zur Ruptur der Zelle führen, was makroskopisch als Eiter sichtbar wird.

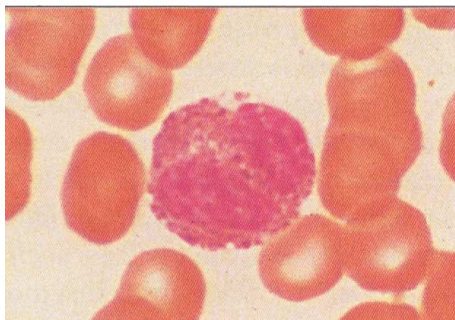
Neutrophile nehmen durch Cytokinproduktion wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-12 auch immunregulatorische Funktionen wahr (Chaplin D.D., 2003).

Sie sterben nach Beendigung ihrer Aufgabe rasch ab und werden von Makrophagen entfernt (Gemsa D. et al., 1997).

1.1.1.2 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten entwickeln sich ebenfalls im Knochenmark. T- Zellen beeinflussen mittels Zytokinausschüttung (z.B. IL-5) deren Wachstum und die Differenzierung. Nach 8- 18 Stunden verlassen die eosinophilen Granulozyten die Blutbahn und wandern in die Gewebe aus, wo man sie in großer Zahl in Lunge und Darmwand findet (Prussin C., Metcalfe D.D., 2003).

Die Aufgaben der eosinophilen Granulozyten sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Sie sind imstande, Mikroorganismen oder Immunkomplexe zu



phagozytieren, obwohl dies nicht ihre eigentliche Funktion zu sein scheint (Roitt I.M. et al., 1995). Vielmehr spielen sie bei der Abwehr von Parasiten, insbesondere Helminthen, eine Rolle, also von Organismen, die aufgrund ihrer Größe nicht

Abb. 1.2: Eosinophiler Granulozyt
(aus Janeway C.A. et al., 2002)

phagozytiert werden können (Janeway C.A. et al., 2002).

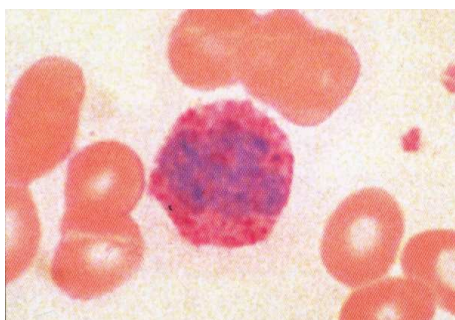
Die Granula der eosinophilen Granulozyten besitzen einen zentralen kristallinen Kern und enthalten zu 50% ‚major basic protein‘, welches hohe Toxizität besitzt und für Gewebeschäden sowie die Hyperreagibilität und Konstriktion der Bronchien beim Asthma mitverantwortlich sein könnte (Prussin C., Metcalfe D.D., 2003).

Daneben findet man kationische Proteine, zu denen eosinophile Peroxidase, eosinophiles Neurotoxin, Kollagenase, Histaminase, Phosphatase und viele mehr zählen und die die Bindung von sauren Farbstoffen wie Eosin verursachen. Die Oberfläche der eosinophilen Granulozyten trägt eine Vielzahl von Rezeptoren für immunologisch aktive Substanzen wie Zytokine (IL-3, IL-5, $\text{TNF}\alpha$, Interferon γ), Komponenten des Komplementsystems (C3a, C5a) und Immunglobuline (IgE, IgG, IgA).

Stimulation der Eosinophilen über diese Rezeptoren führt zu gerichteter Freisetzung des Granulainhaltes und zur Produktion der reaktiven Sauerstoffmetabolite O_2^- , H_2O_2 , HOBr. Gewebeschäden, die bei Entzündungen auftreten, können durch den Kontakt dieser hochtoxischen Stoffe mit der Umgebung erklärt werden. Aktivierte Eosinophile geben außerdem eine große Menge der Leukotriene C4 und D4, des PAF (platelet activating factor) sowie einige Zytokine ab. Diese Substanzen unterhalten die Entzündungsreaktion und führen zur vermehrten Einwanderung weiterer Immunzellen. Neben diesen proinflammatorischen Eigenschaften gibt es allerdings auch Hinweise auf eine möglicherweise antiinflammatorische Funktion der eosinophilen Granulozyten (Gemsa D. et al., 1997), die jedoch weiterer Klärung bedarf.

1.1.1.3 Basophile Granulozyten

Diese Subpopulation besitzt mit lediglich 1% den geringsten Anteil an den im



Blut zirkulierenden Leukozyten. Trotz großer Ähnlichkeit mit den gewebeständigen Mastzellen gehören sie gemeinsam mit den Eosinophilen einer anderen Zelllinie an (Janeway C.A. et al., 2002; Prussin C., Metcalfe D.D., 2003).

Abb. 1.3: Basophiler Granulozyt
(aus Janeway C.A. et al., 2002)

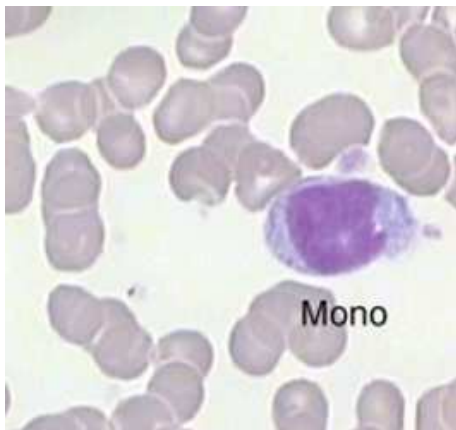
Sowohl Basophile als auch Mastzellen sind durch sich tiefblau färbende Granula charakterisiert, die Histamin, Serotonin, Heparin, ‚major basic protein‘, Chondroitin Sulfat und andere Entzündungsmediatoren enthalten. Desweiteren exprimieren beide Zelltypen hochaffine IgE Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, an die freies IgE über den Fc- Teil gebunden wird (Gemsa D. et al., 1997).

Bereits eine geringe Zahl von Antigenen genügt, diese Rezeptoren kreuzzuvernetzen und so eine Aktivierung der Zelle einzuleiten, die zur Degranulation führt (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Neben der Freisetzung der in Granula gespeicherten Substanzen kommt es durch diesen Reiz ebenfalls zu einer de novo Synthese von Leukotrienen, Prostaglandinen und PAF, sowie zur Expression von IL-4 und IL-13 (Prussin C., Metcalfe D.D., 2003; Gemsa D. et al., 1997). Basophile Granulozyten und deren Mediatoren sind für allergische Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp und nicht-allergische Entzündungsreaktionen gleichermaßen relevant (Gemsa D. et al., 1997) und unterstützen eosinophile Zellen bei der Parasitenbekämpfung.

1.1.2 Monozyten

Monozyten gehören zu dem sogenannten mononukleären Phagozytensystem, ebenso auch alle von ihnen abstammenden Zellen, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen, wie z.B. die Makrophagen der verschiedenen Gewebe. Monozyten stammen von myelopoetischen Zellen des Knochenmarks ab.

Sie stellen mit 10-18µm die größten Zellen des Blutes dar, wo sie mit lediglich 5% einen eher geringen Anteil der weissen Blutzellen ausmachen (Roitt I.M. et



et al., 1995; Pschyrembel, 1994). Neben dem nierenförmigen Zellkern enthält das Zytoplasma „einen ausgeprägten Syntheseapparat zur Erneuerung verbrauchter Proteine“ (Gemsa D. et al., 1997) sowie zahlreiche primäre Lysosomen, die saure Phosphatase, Peroxidase, Lysozyme, Elastase und

Abb. 1.4: Monozyt
(aus www.hmds.org.uk)

Kollagenasen enthalten (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Die Monozyten zirkulieren ca. 70 Stunden im Blut bevor sie durch die Gefäßwände in das Gewebe auswandern und sich zu Makrophagen differenzieren. Bei einer Entzündung wird die Produktion von Monozyten durch bestimmte Zytokine (z.B. IL3, GM-CSF) angetrieben und die Zirkulationszeit im Blut verkürzt.

Eine der wichtigsten Aufgaben der mononukleären Zellen ist die Phagozytose von Mikroorganismen und geschädigtem oder gealtertem körpereigenem Gewebe. Häufig sind Mikroorganismen bereits durch Opsonine markiert, bevor sie über entsprechende Rezeptoren aufgenommen werden. Mikroorganismen oder anderen Zellen können jedoch auch über Zuckermoleküle oder Lipopolysaccharide auf ihrer Oberfläche direkt an Rezeptoren der Monozytenmembran binden (z.B. CD14 für LPB) und auf diese Weise ins Zellinnere aufgenommen werden (Delves P.J., Roitt I.M., 1998; Roitt I.M. et al., 1995). Die internierten Zellen werden durch mikrobizide Substanzen abgetötet und schließlich mit Hilfe lysosomaler Enzyme verdaut. Durch den Differenzierungsprozess haben Makrophagen ihre Peroxidase- Aktivität verloren. Nur durch Aktivierung der Makrophagen, z.B. durch Interferon γ der T- Zellen, erlangen sie die Fähigkeit, Mikroorganismen und Zellen unschädlich zu machen, wieder zurück (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).

Aktivierte mononukleäre Zellen sind außerdem in der Lage, gegen intrazellulär lebende Mikroorganismen wie Mykobakterien und Listerien sowie gegen neoplastisch transformierte Zellen vorzugehen (Gems D. et al., 1997).

Monozyten und Makrophagen sezernieren biologisch aktive Substanzen (Delves P.J., Roitt I.M., 1998), die entweder konstitutiv oder nach Aktivierung freigesetzt werden. Dazu gehören Sauerstoffradikale, Arachidonsäuremetabolite wie Prostaglandine und Thromboxan, Komplementkomponenten, zahlreiche Enzyme (Elastase, Kollagenase, Plasminogen- Aktivator, lysosomale saure Hydrolasen, α 1Antitrypsin) und Zytokine. Letztere sind lösliche Proteine, die der interzellulären Signalübermittlung dienen und Wachstum und Funktion von Immunzellen regulieren. Zu den wichtigsten von mononukleären Zellen produzierten Zytokinen gehören IL-1 und TNF α , die auch eine große Rolle bei der Aktivierung von Monozyten spielen und als Pyrogene wirksam sind, des weiteren IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN γ und GM-CSF. Von den Makrophagen sezernierte Wachstumsfaktoren helfen auch bei der anschließenden Reparatur des durch Entzündung oder Verletzungen geschädigten Gewebes.

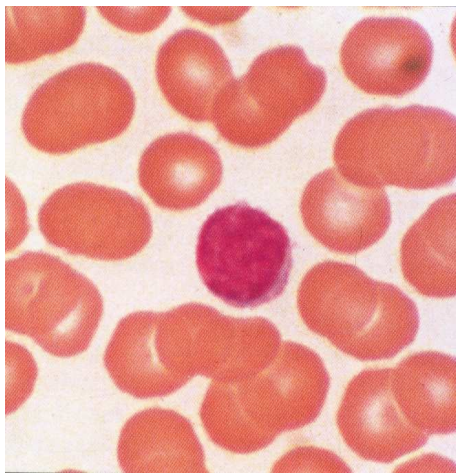
Neben unzähligen, auf der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren für Immunglobuline, Zytokine, Wachstums- und Komplementfaktoren und Adhäsionsmolekülen (Delves P.J., Roitt I.M., 1998) findet man Moleküle der MHC Klasse II, mit deren Hilfe den T4+- Lymphozyten prozessierte Antigene

präsentiert werden. Zusätzliche Lymphozytenstimulation wird durch Sekretion von IL-1 erreicht.

Sekretion von Zytokinen und Antigenpräsentation verdeutlichen die enge Kooperation zwischen Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunreaktion.

1.1.3 Lymphozyten

Lymphozyten gehören im Gegensatz zu Monozyten und Granulozyten zur lymphatischen Zellreihe. Sie machen circa



20% der weißen Blutkörperchen des Blutes aus (Roitt I.M. et al., 1995). Lymphozyten sind als Zellen der erworbenen Immunabwehr in der Lage, einzelne Antigene spezifisch zu erkennen. Diese einzigartige Eigenschaft kommt durch Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zustande, die jeden reifen Lymphozyten individuell

Abb. 1.5: Lymphozyt
(aus Janeway C.A. et al., 2002)

befähigen, zielgerichtet gegen ein bestimmtes Pathogen vorzugehen.

Morphologisch werden zwei Formen unterschieden: Die kleineren Lymphozyten mit einem Durchmesser von 8-10µm besitzen einen im Vergleich zum Zytoplasma sehr großen Zellkern, aber keine Granula.

Die größeren Lymphozyten weisen ein niedrigeres Kern- Plasma- Verhältnis auf und werden aufgrund zahlreicher azurophiler Granula zu den sogenannten ‚large granular lymphocytes‘ gezählt. Trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit unterscheiden sich die kleinen Lymphozyten in ihrer Funktion und lassen sich so in zwei große Gruppen unterteilen, B- und T- Lymphozyten, die im weiteren getrennt beschrieben werden.

1.1.3.1 B- Lymphozyten

B- Zellen sind wichtiger Bestandteil der humoralen Immunantwort. Sie wurden nach dem Ort ihrer Entwicklung bei Vögeln, der Bursa Fabricii, benannt. Säugetieren fehlt ein entsprechendes Organ, hier werden die B- Zellen im Knochenmark produziert und reifen auch dort heran. Über die Blutbahn werden sie zu den lymphatischen Organen transportiert, wo sie sich vor allem in Follikeln der Lymphknoten und der Marginalzone der weißen Milzpulpa ansiedeln. Da sie hauptsächlich ortständig bleiben, können nur ca. 15% der zirkulierenden lymphatischen Zellen als B- Lymphozyten identifiziert werden (Delves P.J., Roitt I.M., 1998; Chaplin D.D., 2003).

Auf ihrer Zelloberfläche tragen B- Zellen Immunglobuline, die als Rezeptoren zur Antigenerkennung dienen. Anfangs gehören diese Immunglobuline den Klassen IgM und IgD an (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Rezeptoren eines B- Lymphozyten sind spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Diese ungeheure Vielfalt von Immunglobulinen wird durch freie Kombination von Genen erreicht. Werden die Rezeptoren von einem Antigen stimuliert, kommt es, oft mit Hilfe der T- Zellen, zur Aktivierung dieses B- Lymphozyten, der sich zunächst mitotisch teilt und so einen antigenspezifischen B- Zellklon erzeugt. Dieser Prozess wird auch als klonale Selektion bezeichnet (Roitt I.M. et al., 1995).

Viele dieser Zellen wandeln sich zu Plasmazellen um und produzieren eine lösliche Form ihrer Oberflächenrezeptoren, die als Antikörper bezeichnet wird (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Plasmazellen besitzen einen randständigen Kern mit perinukleärem Halo, der durch den ausgeprägten Golgi- Apparat verursacht wird, und ein prominentes rauhes endoplasmatisches Retikulum.

Die Basophilie des Zytoplasmas lässt sich durch den großen Anteil von RNA zur Immunglobulinsynthese erklären. Man findet sie selten im Blut, da sie sich hauptsächlich in den lymphatischen Organen aufhalten (Abbas A.K. et al., 1996). Die von ihnen sezernierten Antikörper sind in der Lage, Komplement zu aktivieren, und dienen der Opsonierung von Mikroorganismen, die dadurch leichter von Zellen der unspezifischen Abwehr (Monozyten, neutrophile Granulozyten) erkannt und unschädlich gemacht werden können.

Einige Zellen des aktivierten B- Zellklons differenzieren sich zu sogenannten Gedächtniszellen aus, kleinen, langlebigen Zellen, die bleibende Immunität verleihen. Sie bilden Antigenrezeptoren, die zwar spezifisch für das Antigen sind, durch das der B- Zellklon stimuliert wurde, die jedoch einer anderen Immunglobulinklasse angehören, wie z.B. IgG, IgA oder IgE, nicht aber IgD oder IgM (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Die Art der von T- Zellen produzierten Zytokine entscheidet, welche Immunglobulinklasse zukünftig von der B- Zelle sezerniert wird (Chaplin D.D., 2003). Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen erfolgt die Sekundärantwort durch die schon vorhandenen Gedächtniszellen schneller und mit erhöhter Effizienz.

B- Lymphozyten tragen neben den für sie typischen Antigenrezeptoren und ubiquitär vorhandenen Membranproteinen wie MHC I und FAS natürlich noch weitere Strukturen auf ihrer Zelloberfläche, die als Zytokinrezeptoren oder Adhäsionsmoleküle fungieren oder sie wie MHC II zur Antigenpräsentation befähigen. Wie bei allen Leukozyten findet man auch CD45, ein Transmembranprotein mit Phosphatase- Aktivität. Als B- zellspezifisch gelten CD19 und CD22 (Delves P.J., Roitt I.M., 1998), die beide als Markermoleküle zur Identifizierung von B- Zellen genutzt werden.

1.1.3.2 T- Lymphozyten

Zusammen mit den B- Lymphozyten gehören die T- Zellen der spezifischen Immunabwehr an. Sie reifen im Thymus heran, wodurch sie ihren Namen erhielten. Reife T-Lymphozyten gelangen mit dem Blutstrom in periphere lymphatische Organe, wo sie sich in der parakortikalen Region der Lymphknoten bzw. der periarteriolen Lymphscheiden der Milz ansiedeln (Gemsa D. et al., 1997). Im Gegensatz zu den B- Zellen sind sie nicht an diesen Ort gebunden, sondern können in die Blutbahn rezirkulieren und stellen daher mit 60-80% den weitaus größten Anteil der Lymphozyten im Blut (Gemsa D. et al., 1997).

T- Lymphozyten tragen den Immunglobulinen der B- Zellen strukturell verwandte Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die T- Zellrezeptoren, die ebenfalls nur für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind. Jedoch können sie dieses nur erkennen, wenn es ihnen zusammen mit einem MHC- Molekül von einer anderen Zelle präsentiert wird. Auf lösliche Antigene können T- Lymphozyten nicht reagieren.

Alle T- Zellen sind durch einen mit dem T- Zellrezeptor assoziierten Komplex gekennzeichnet, CD3 genannt, der aus 5 Untereinheiten besteht und dessen Phosphorylierung eine Reaktionskaskade auslöst, die letztendlich zur Aktivierung von Genen führt, die für die Proliferation und Differenzierung der Zelle verantwortlich sind (Delves P.J., Roitt I.M., 1998). Voraussetzung für die Aktivierung der T- Zelle ist die gleichzeitige Interaktion zusätzlicher, co-stimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der T- Zelle wie z.B. CD28 mit von der Antigenpräsentierenden Zelle gebildeten Rezeptoren der B7 -Familie (Chaplin D.D., 2003).

Folge dieser Art der Antigenpräsentation ist die Proliferation der angeregten Zelle nach dem oben bereits erwähnten Prinzip der klonalen Selektion mit Ausbildung von Effektor- und Gedächtniszellen.

T- Lymphozyten werden im allgemeinen anhand ihrer Funktion und Oberflächenstrukturen weiter differenziert. Durch Antigenstimulation angeregt, unterstützen **T- Helferzellen** die B- Zellen mittels Zytokinproduktion in ihrer Entwicklung zur Plasma- bzw. Gedächtniszelle. Auch andere T- Zellen, Monozyten und Granulozyten werden von diesen Proteohormonen aktiviert (Abbas A.K. et al., 1996). T- Helferzellen werden aufgrund unterschiedlicher Zytokinproduktion noch einmal in TH1- und TH2- Zellen unterteilt. TH1 sezernieren IFN γ , IL-2, und TNF β und induzieren die Proliferation aller T- Zellen, TH2- Zellen dagegen setzen hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 frei (Chaplin D.D., 2003). Sie beeinflussen vor allem die B- Lymphozyten (Roitt I.M. et al., 1995). Beiden Subpopulationen gemeinsam sind die CD4- Moleküle auf der Oberfläche, die als charakteristische Marker der T- Helferzellen gelten.

Zytotoxische T- Zellen exprimieren typischerweise CD8. Sie haben die Aufgabe, virusinfizierte oder neoplastische Zellen zu erkennen und zu lysieren, indem sie entweder die veränderte Zelle mittels FAS- Liganden zur Apoptose stimulieren oder den Inhalt ihrer Granula abgeben. Die freigesetzten Perforine stören die Integrität der Zellmembran der Zielzelle, sodass diese zugrunde geht. Vielfach benötigen zytotoxische T- Zellen für ihre Funktion die Hilfe von T- Helferzellen.

Die Entscheidung, ob eine T- Zelle sich zu einer Helfer- oder einer zytotoxischen T- Zelle ausbildet, fällt im Thymus. Dort kommen die zunächst noch sowohl CD4- als auch CD8- positiven Zellen mit Thymuszellen in Kontakt und werden an MHC Klasse I oder II Molekülen auf ihre Tauglichkeit geprüft, an diesen Rezeptor zu binden. Zellen, die an MHC Klasse I Molekülen positiv getestet werden, entwickeln sich zu zytotoxischen Zellen, die nur noch CD8 exprimieren, spätere CD4- positive T- Helferzellen haben die positive Selektion an MHC II erfolgreich bestanden (Chaplin D.D., 2003).

T- Lymphozyten sind auch in der Lage, die Stärke einer Immunreaktion abzuschwächen. Eigens dafür verantwortliche ‚Suppressor‘- T- Zellen scheinen jedoch nicht zu existieren. Diese Aufgabe wird wohl von zytotoxischen und T- Helferzellen gemeinsam wahrgenommen (Gemsal D. et al., 1997).

1.1.3.3 Natürliche Killerzellen

Diese dritte Gruppe der Lymphozyten weist weder T- noch B- zellspezifische Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche auf. Dies hat zur Folge, dass sie Antigene nicht spezifisch erkennen können und somit wie die Granulozyten und mononukleären Zellen der angeborenen Immunabwehr zugeordnet werden. Sie entsprechen morphologisch den großen granulierten Lymphozyten, zu denen noch einige wenige T-Zellen gehören. Ihre Fähigkeit, ohne vorherige Antigenstimulation tumoröse oder virusinfizierte Zellen zu lysieren, wird durch die von Makrophagen sezernierten Cytokine IL-12, IFN α und IFN β 20-100 mal verstärkt (Janeway C.A. et al., 2002).

NK Zellen tragen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die MHC I Moleküle auf Körperzellen erkennen. Bindung an MHC I verhindert die Lyse dieser Zellen. Dies hat zur Folge, dass Zellen, die keine oder nur wenige MHC I besitzen, den Natürlichen Killerzellen zum Opfer fallen (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).

Um den Zelltod einzuleiten, bindet die Natürliche Killerzelle an die MHC-veränderten Zielzellen und entlässt Perforine und DNA- schädigende Enzyme aus ihren Granula, die dann entweder zur Zellnekrose führen oder die Apoptose der Zelle induzieren (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).

Auf diese Weise können die NK Zellen die Replikation von Viren oder intrazellulär lebenden Bakterien stoppen und die Entwicklung von Tumoren und Metastasen limitieren.

Daneben produzieren sie zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Interferon, IL-1, IL-10, TNF α und TNF β . Ihr Anteil an den im Blut zirkulierenden Lymphozyten beträgt bis zu 15% (Roitt I.M. et al., 1995).

Um sie zu identifizieren bedient man sich monoklonaler Antikörper gegen CD16 und CD56.

1.2 Flowzytometrie

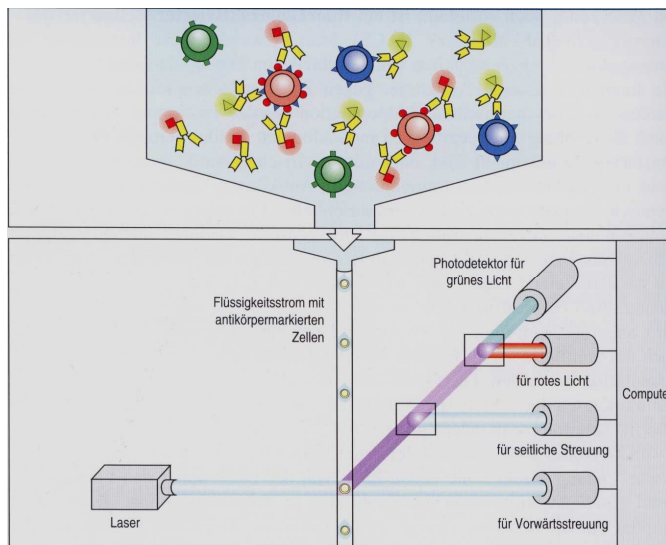
Bei der Flowzytometrie handelt es sich um ein vom Untersucher unabhängiges Verfahren, mit dessen Hilfe in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen oder Zellbestandteilen erfasst werden kann, was zu einer hohen statistischen Sicherheit der Ergebnisse führt.

Das Prinzip der Flowzytometrie besteht darin, Zellen mittels ihrer Größe, Granularität und charakteristischen Oberflächenantigenen zu differenzieren (Hastka, 1997). Die Ergebnisse sind nicht einfach Durchschnittswerte der Gesamtpopulation, sondern Daten, die von jedem einzelnen Partikel erhoben wurden (Ormerod M.G., 1994).

Die Zellen werden vor der Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die an bestimmte Strukturen in oder an der Zelle binden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Probe mit einem spezifischen Antikörper zu inkubieren, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (direkte Immunfluoreszenz). Alternativ bietet sich die indirekte Immunfluoreszenz an, bei der ein Primärantikörper durch einen sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen wird (Burmester G.R., Pezzutio A., 1998).

Das Zellgemisch wird durch Druckluft in eine Kapillare gepresst und in eine vibrierende Fließkammer transportiert (Hastka, 1997), wo die Probe von Trägerflüssigkeit umgeben, beschleunigt und in Einzelzellen aufgetrennt wird.

Diesen Vorgang bezeichnet man hydrodynamische Fokussierung (Raffael A.,



1988). Im Zentrum der Trägerflüssigkeit erreichen die Partikel nacheinander den Analysepunkt (Longobardi G.A., 1992). Dort trifft das Licht eines Lasers auf die Zellen. Die dadurch verursachten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von

Abb. 1.6: Schematischer Aufbau eines Flowzytometers
(aus Janeway C.A. et al., 2002)

Photomultipliern aufgefangen (Ormerod M.G., 1994). Der größte Anteil des Streulichtes gelangt nach vorne (FSC = forward scatter)(Raffael A., 1988). Der Photodetektor, der dieses Streulicht registriert, ist mit einem schmalen Metallstreifen vor direkt einfallendem Laserlicht geschützt. Nur Lichtstrahlen, die von einem Partikel abgelenkt wurden, können diese Schranke umgehen und ein Signal erzeugen (Longobardi G.A., 1992). Da größere Partikel an ihrer Oberfläche mehr Licht streuen als kleinere desselben Refraktionsindex, korreliert dieser Parameter mit der Zellgröße (Longobardi G.A., 1992). Die übrigen Photomultiplier sind rechtwinklig zum Laserstrahl angeordnet. Sie unterscheiden sich durch die Farbe ihrer Filter, welche nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchdringen lassen. Im Fall des Seitwärtsstreulichts (SSC = side scatter) ist es die Farbe des Lasers (Longobardi G.A., 1992). Das Seitwärtsstreulicht gilt als Maß für Granularität und Irregularität der Zellen (Raffael A., 1988).

Die an die Zelle gebundenen Farbstoffe werden von dem Laserstrahl angeregt und emittieren Licht einer charakteristischen Wellenlänge (FITC 530-550 nm, grün; PE 560-580 nm, rot), das auf die Detektoren trifft. Je mehr Antigen auf der Zelle exprimiert wird, d.h. je mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden werden, desto höher ist die Intensität des Fluoreszenzlichtes (Burmester G.R., Pezzutio A., 1998).

Möchte man mehrere Antikörper parallel einsetzen, ist es ratsam, Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, die Licht einer Wellenlänge absorbieren, die der des Lasers entspricht (Argonlaser: 488nm), jedoch unterschiedliche Emissionsmaxima besitzen, um eine Überstrahlung von einem Fluoreszenzkanal auf den anderen so gering wie möglich zu halten (Raffael A., 1988).

Die Lichtsignale werden von den Photodetektoren in elektrische Impulse umgewandelt (Longobardi G.A., 1992) und linear oder logarithmisch verstärkt (Raffael A., 1988). Aufgrund der Spannweite, die Fluoreszenzintensitäten erreichen können, werden die Fluoreszenzsignale meist logarithmisch verstärkt.

Lineare Verstärkung dagegen wird üblicherweise bei den Streulichtsignalen bevorzugt (Longobardi G.A., 1992). Ein ADC (analog to digital converter) übersetzt die elektrischen Impulse jedes Zellparameters dann in binäre Zahlen (Ormerod M.G., 1994), indem er die Signale je nach Intensität in einen der 256 oder 1024 Kanäle einordnet, wobei die Anzahl der Kanäle vom Gerätetyp abhängt (Longobardi G.A., 1992). Folglich kann jede Zelle nun durch mindestens 5 verschiedene Werte charakterisiert werden, die die Intensitäten von FSC, SSC und mindestens 3 Fluoreszenzen angeben (Longobardi G.A., 1992).

Flowzytometer wurden ursprünglich dazu konzipiert, Zellen anhand bestimmter Signale aufzutrennen (Longobardi G.A., 1992). Einige Geräte, die fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) haben diese Fähigkeit erhalten (Abbas K.A. et al., 1996). Der Flüssigkeitsstrom wird durch die Vibration der Fließkammer in einzelne Tropfen unterteilt, die nur eine einzige Zelle enthalten (Longobardi G.A., 1992). Diese werden, nachdem sie den Analysepunkt passiert haben, unter Computerkontrolle elektrisch beladen (Janeway C.A. et al., 2002). Tropfen, die eine fluoreszenzmarkierte Zelle enthalten, erhalten eine positive Ladung, Tropfen mit Antigen- negativen Zellen eine negative (Burmester G.R., Pezzutio A., 1998). Der Tropfenstrom wird anschließend an entgegengesetzt polarisierten Ablenkungsplatten vorbeigeleitet (Janeway C.A. et al., 2002). Dadurch werden die Tropfen nach Ladung sortiert und gesammelt (Hastka, 1997). Man erzielt mit dieser Methode eine hohe Reinheit der Zellen (Burmester G.R., Pezzutio A., 1998).

Heute wird die Flowzytometrie nicht nur in der Forschung, sondern zunehmend auch in der Routinediagnostik eingesetzt. In den letzten Jahren hat sich ihr Anwendungsgebiet stark erweitert, was sicherlich der Verbesserung der Fluoreszenzfarbstoffe und dem größeren Angebot der monoklonalen Antikörper zu verdanken ist (Raffael A., 1988). Neben der Immunphänotypisierung, der Auftrennung von einzelligen Organismen und subzellulären Partikeln, sowie der DNS- Analyse, dient die Flowzytometrie nun ebenfalls der Funktionsanalyse einzelner Zellen (Delves P.J., Roitt I.M., 1998).

1.3 Leukozyten im Ejakulat

1.3.1 Labordiagnostik

Neben Spermatozoen und unreifen Germinalzellen werden in fast allen Ejakulaten im Rahmen einer Untersuchung auch Immunzellen festgestellt (Wolff H., 1995).

Die Leukozytenzählung gehört zur Routinediagnostik eines andrologischen Labors, da im allgemeinen erhöhte Leukozytenzahlen im Sperma als Hinweis auf eine mögliche Infektion des männlichen Genitaltraktes gewertet werden.

Jedoch ist es nicht immer leicht, die Leukozyten von den Germinalzellen zu unterscheiden.

Verwendet man Färbungen nach Giemsa oder Papanicolaou, ähneln Granulozyten den mehrkernigen Spermatiden, Lymphozyten und Monozyten den Spermatozyten (Wolff H., 1995).

Die Bryan- Leishman Färbung, erstmals publiziert von Couture in 1976, ist besser geeignet, scheint jedoch zu einer Überschätzung der Lymphozyten und Unterschätzung der Granulozyten zu führen (Wolff H., 1995).

Als Goldstandard gilt heute die immunhistochemische Bestimmung der Leukozyten mittels monoklonaler Antikörper gegen Pan- Leukozyten- Antigen (z.B. CD45). Nachteile dieser Methode sind jedoch die hohen Kosten und der große Arbeitsaufwand.

Aus diesem Grund werden die Immunzellen am häufigsten mit Hilfe der Peroxidase- Reaktion bestimmt, die allerdings lediglich die Granulozyten durch Braunfärbung von den anderen Rundzellen hervorhebt.

Ebenfalls gebräuchlich ist die Bestimmung der Granulozytenelastase im Ejakulat. Dieses Enzym wird von aktivierten Granulozyten abgegeben und kann im Seminalplasma gemessen werden (Wolff H., 1995).

1.3.2 Vergleich der Leukozytenverteilung im Blut/ Ejakulat

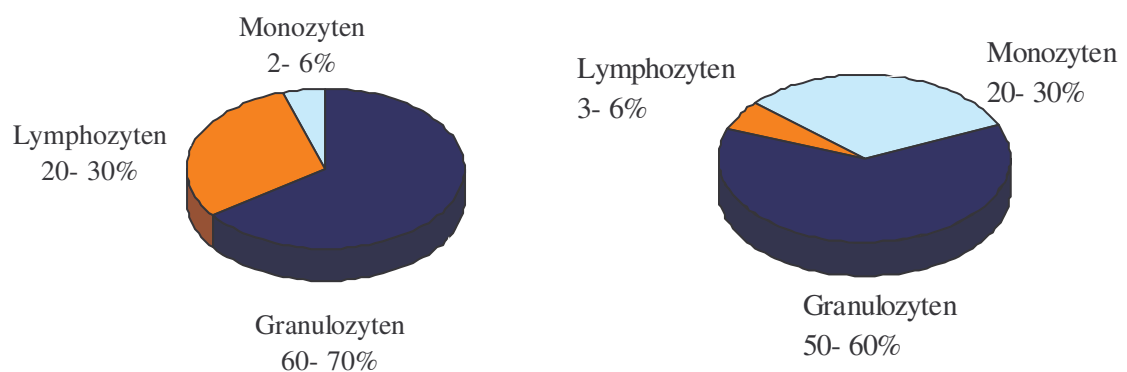


Abb. 1.7: Prozentualer Anteil der Leukozytensubpopulationen im Blut (linkes Diagramm, nach Pschyrembel, 1994) und Ejakulat (rechtes Diagramm, nach Krause W. und Weidner W., 1998)

Während die Leukozytenverteilung im Blut hinreichend erforscht ist, findet man bezüglich der Häufigkeitsangaben der Leukozytensubpopulationen im Ejakulat divergierende Angaben.

Die meisten Autoren sind der Auffassung, dass die Granulozyten mit etwa 60% im Sperma dominieren. Die Monozyten sind, im Gegensatz zum peripheren Blut, im Ejakulat die zweithäufigste Fraktion, während Lymphozyten nur in geringerem Maße zu finden sind.

1.3.3 Ursprung der seminalen Leukozyten

Studien, die sich mit der Frage nach der Herkunft der im Ejakulat vorkommenden Immunzellen befassen, sind rar. Wolff H. (1995) gelangt durch histologische Befunde und Untersuchungen von vasktomierten Patienten zu dem Schluß, dass Lymphozyten und Makrophagen hauptsächlich aus Rete Testis und Epididymis stammen, Granulozyten dagegen vor allem aus der Prostata, wenige auch aus den Samenbläschen.

Simbini T. und Umapathy E. (1998) beschäftigten sich ebenfalls mit diesem Thema, indem sie die Leukozytenzahl in den split ejaculate- Proben untersuchten. Auch ihrem Ergebnis zufolge stammen die seminalen Leukozyten hauptsächlich aus Testis, Epididymis und der Prostata, wohingegen die Samenbläschen nur wenige Zellen beisteuern. Eine Unterteilung in die Leukozytensubpopulationen wurde nicht vorgenommen.

Tomlinson M.J. et al. (1993) stellen aufgrund ihrer Untersuchungen, die eine positive Korrelation zwischen Spermatozoendichte und Anzahl der Makrophagen ergaben, die Hypothese auf, dass seminale Makrophagen vom Epididymis ins Ejakulat übergehen und nicht von Prostata und Samenbläschen.

Weitere Arbeitsgruppen untersuchten das Vorkommen von Leukozyten in Geweben des männlichen Genitaltraktes.

Eine neuere Studie von Frungieri M.B. et al. (2002) beschäftigte sich mit der Verteilung der mononukleären Zellen im Hodengewebe. Danach befinden sich die meisten Makrophagen im Interstitium; sie sind allerdings auch in der Wand und dem Lumen der Tubuli seminiferi lokalisiert, vor allem dann, wenn Störungen der Spermatogenese vorliegen.

Yakirevich E. et al. (2002) konnten vor allem T- Lymphozyten im Epithel von Rete testis, Epididymis und Vas deferens bestimmen. Moser P.L. et al. (2002) kamen zu dem Ergebnis, dass T- Lymphozyten auch im Gewebe der Prostata vorherrschten.

Marchlewicz M. (2001) wies T- Lymphozyten und Makrophagen im Nebenhoden nach, B- Lymphozyten waren weder im Epithel noch im Interstitium sichtbar.

Mittels indirekter Immunoperoxidase- Technik untersuchten el-Demiry M.I. et al. (1985) Gewebe von Testis, Epididymis, Vas deferens, Prostata und Samenblase und fanden T- Lymphozyten des zytotoxischen Typs als vorherrschende Zellgruppe. Wenige B- Zellen konnten im Stroma der Prostata nachgewiesen werden.

Letztendlich kann die Frage nach dem Ursprung der seminalen Leukozyten noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden (Fraczek M. et al., 2004).

1.3.4 Leukozytospemie

1.3.4.1 Definition

Nach WHO- Richtlinien ist unter Leukozytospemie eine Konzentration von mehr als 1×10^6 Leukozyten/ml im Ejakulat zu verstehen. Häufigkeitsangaben in der Literatur hängen vom Patientenkollektiv und den Untersuchungsmethoden ab. So konnte Wolff H. (1995) die Prävalenz bei Patienten mit Fertilitätsstörungen mit 10-20% angeben. Ebenso fanden Novotny J., Oborna I. (2003) bei Infertilitätspatienten in 19,1% der Ejakulatproben eine Leukozytenkonzentration vor, die die von der WHO gesetzte Schwelle zur Leukozytospemie überschritt. Die Inzidenz der Leukozytospemie wird von Yanushpolsky E.H. et al. (1995) mit 7% angegeben. Tomlinson M.J. et al. (1993) dagegen beziffern die Häufigkeit der Leukozytospemie mit lediglich 2,7%, obwohl auch sie Ejakulate von Infertilitätspatienten untersuchten.

Der Begriff Leukozytospemie beschreibt ein Symptom, keine Krankheit und sagt auch nichts über mögliche Ursachen aus. Verantwortlich für eine erhöhte Leukozytenzahl im Ejakulat können ganz unterschiedliche Faktoren sein. Zunächst sollte immer eine bakterielle Infektion des Urogenitaltraktes ausgeschlossen werden. Auch bei asymptomatischen Patienten ohne Anhaltspunkt für eine infektiöse Genese der Leukozytospemie wird aus diesem Grund häufig eine mikrobiologische Untersuchung des Ejakulates auf die wichtigsten pathogenen Keime (*Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* und *E. coli*) durchgeführt (Wolff H., 1995).

Als weitere mögliche Auslöser einer Leukozytospemie kommen virale Infektionen in Betracht (Melaine N. et al., 2003). Wolff H. (1995) ist der Meinung, dass in einigen Fällen HIV, Zytomegalievirus oder Hepatitis B Virus zur Erhöhung der seminalen Leukozyten führen könnten. Krause W. et al. (2002) untersuchten Patienten mit erhöhten Leukozytenzahlen im Ejakulat auf eine Infektion mit CMV, Epstein- Barr Virus und Herpes simplex Virus. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten lediglich HSV IgM häufiger im Serum nachgewiesen werden.

Auch chemische Noxen wie Alkohol-, Marihuana- und Zigarettenkonsum (Close C.E., Roberts P.L. 1990; Trummer H. et al., 2002) könnten Ursache einer Leukozytospemie sein. Weiterhin wurden erhöhte Leukozytenzahlen im Ejakulat bei Patienten mit Traumata und Querschnittslähmung (Trabulsi E.J., 2002), Varikozele (Tortolero I. et al., 2004) und Neoplasien beschrieben. Wolff H. (1995) postuliert, dass möglicherweise auch sexuelle Abstinenz eine Erhöhung der Leukozytenzahlen im Ejakulat bewirken könnte. Je länger die Spermatozoen im Nebenhoden gespeichert würden, desto mehr Makrophagen und Granulozyten würden von alternden Spermatozoen angezogen.

Eine grosse Zahl der Fälle von Leukozytospemie bleibt aber auch nach Ausschluss aller möglichen Ursachen ungeklärt.

Von vielen Autoren wird die von der WHO festgesetzte Grenze von 1×10^6 WBC kritisch beurteilt. Beispielsweise sprechen Punab M. et al. (2003) diesem Wert eine sehr niedrige Sensitivität zu, um zwischen Patienten mit und ohne signifikanter Bakteriospermie zu unterscheiden. Besser ist ihrer Meinung nach eine niedrigere Grenze von $0,2 \times 10^6$ WBC geeignet.

Ebenso findet Wolff H. (1995) den von der WHO vorgegebenen Wert ungenügend. Er plädiert zum einen dafür, neben der Konzentration der weissen Blutzellen auch deren Zahl pro Ejakulat zu berücksichtigen, zum anderen hält er eine höhere Grenzwerte von 2×10^6 WBC für angebracht.

De Geyter C. et al. (1994) setzt den Grenzwert sogar noch höher. Er konnte keine negativen Einflüsse bei Leukozytenkonzentrationen unter 6×10^6 /ml auf die Ejakulatparameter erfassen.

Somit äussern viele Autoren wie Vicari E. (1999) die Meinung, dass die von der WHO gesetzte Grenze kritisch überdacht werden sollte.

1.3.4.2 Leukozytospemie und männliche Infertilität

Wie Aitken R.J. und Baker H.W.G. (1995) sowie Kiessling A.A. et al. (1995) bei der Wahl der Überschrift ihrer Artikel treffend formulierten, ist der Einfluss der seminalen Leukozyten auf die männliche Fertilität schon längere Zeit umstritten und bis heute Gegenstand der Diskussion.

Die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen zeigen einen negativen Einfluss auf bestimmte Ejakulatparameter in Anwesenheit von weissen Blutkörperchen, der hauptsächlich der Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) zugeschrieben wird.

Andere Autoren argumentieren, dass erhöhte Leukozytenzahlen nicht Ursache, sondern Folge schlechter Spermienqualität seien, da die Leukozyten als phagozytische Zellen die Entsorgung abnormer Spermatozoen übernehmen.

Einige Arbeitsgruppen wiederum konnten in ihren Studien keinerlei Auswirkungen von Leukozyten auf die von ihnen untersuchten Parameter erkennen.

In der folgenden Tabelle sind die Meinungen verschiedener Arbeitsgruppen zu diesem Thema in vereinfachter Form zusammengestellt.

Autor	negativer Einfluss	positiver Einfluss	kein Einfluss
Henkel R. et al., 2003	Spermatozoenkonzentration Akrosomreaktion	Morphologie bei Oligozoospermie	Fertilität und Schwangerschaft bei IVF
Erenpreiss J. et al., 2002	Motilität		
Alvarez J.G. et al., 2002	Anstieg unreifer Germinalzellen Morphologie		
Saleh R.A. et al., 2002	Motilität Morphologie		
Ricci G. et al., 2000			Ejakulatparameter
Kaleli S. et al., 2000		Spermatozoenkonzentration Akrosomreaktion	Motilität
Rodin D.M. et al., 2003			Ejakulatparameter

Tab. 1.1: Studien zum Einfluss der seminalen Leukozyten auf verschiedene Ejakulatparameter

Fortsetzung Tab. 1.1			
Autor	neg. Einfluss	pos Einfluss	Kein Einfluss
Omu	Ejakulatparameter (Spermatozoenzahl, Motilität, Morphologie, Membranintegrität, ASA)		
Aitken R.J. et al., 1994			Morphologie Motilität Akrosom-reaktion Fusion von Spermium- Oozyt
Kiessling A.A. et al., 1995		Morphologie Motilität	
Yanushpolsky E.H., 1996	Spermatozoenkonzentration, Morphologie		
Simbini T., Umapathy E., 1998	Spermatozoenzahl, Morphologie, progressive Motilität		
Tomlinson M.J. et al., 1993		Morphologie, Spermatozoendichte, Spermatozoenqualität, Schwangerschaftsrate	
Wolff H. et al., 1990	Gesamtspermatozoenzahl, Prozentsatz motiler Spermatozoen, Gesamtzahl motiler Spermatozoen, Spermatozoengeschwindig- keit, Spermatozoen- Motilitätsindex, Ejakulatvolumen		
El- Demiry M.I.M. et al., 1986			Spermatozoen- dichte, Motilität, Fertilität
Arata de Bellabarba G. et al., 2000	Motilität, Morphologie		
Tortolero I. et al., 2004	Spermatozoenkonzentration, Motilität		

1.3.4.3 Therapie der Leukozytospemie

Die Ursachen der Leukozytospemie sind vielfältig, dementsprechend auch die Versuche, therapeutisch dagegen vorzugehen.

Antibiotika wie Doxycyclin, Levofloxacin oder Trimethoprim- Sulfamethoxazol sind nur sinnvoll, wenn man von einer bakteriellen Genese der Leukozytospemie ausgeht. Studien, die Patienten mit einer asymptomatischen Leukozytenerhöhung im Ejakulat mittels Antibiose behandelten, konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ejakulatparameter im Vergleich zur unbehandelten Patientengruppe feststellen (Krisp A. et al., 2003 ; Erel C.T. et al., 1997; Yanushpolsky E.H. et al., 1995). Yanushpolsky E.H. et al. (1995) konnten nachweisen, dass auch ohne Behandlung bei 82% der asymptomatischen Patienten die Leukozytospemie lediglich transient war.

Dazu kommt, dass einige Antibiotika einen schädigenden Einfluss auf die Ejakulatqualität besitzen. Beispielsweise wurden nach einer Therapie mit Trimethoprim eine Reduktion der Spermienkonzentration sowie der Gesamt-motilen Spermatozoen um >30% beobachtet (Yanushpolsky E.H. et al., 1995).

Eine mögliche Alternative bietet die Behandlung mit nicht- steroidalen Antiphlogistika. Montag M. et al. (1999) konnten eine Verbesserung der Spermienzahl und eine Reduzierung der Leukozyten im Ejakulat nach einer anti-inflammatorischen Therapie mit Diclofenac in Kombination mit Doxycyclin beobachten.

Jedoch sehen die meisten Autoren in einer asymptomatischen Leukozytospemie keinen Grund zu Behandlung.

1.3.5. ROS

Zu den ROS (reaktive oxygen species) gehören Superoxidanionen (O_2^-), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Hydroxylionen, die von aktivierten Granulozyten mit Hilfe der NADPH- Oxidase gebildet werden. Sie dienen in erster Linie dazu, Mikroorganismen unschädlich zu machen, können allerdings auch körpereigene Gewebe schädigen (Wolff H., 1995).

Die Spermatozoenmembran ist durch einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren gekennzeichnet, der die Membranfluidität bedingt (Ochsendorf F.R., 1998). Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion von Zellmembranen während Fertilisierung (Krause W. et al., 2003).

Durch Angriffe von ROS werden ungesättigte Fettsäuren durch Oxidation in gesättigte Fettsäuren umgewandelt. Dadurch wird die Membranfluidität sowie die Motilität des geschädigten Spermatozoons reduziert.

Im Gegensatz zu anderen Körperzellen besitzen Spermien nur geringe Mengen Zytoplasma, welches durch antioxidativ wirkende Substanzen die Zelle vor der Einwirkung von Radikalen schützt. Zusätzlich ist das Zytoplasma der Spermatozoen nicht gleichmäßig verteilt, so dass der Schwanzbereich und besonders die funktionell wichtige Akrosomregion nicht genügend geschützt sind (Ochsendorf F.R., 1998).

Dieses Handicap wird durch protektiv wirksame Stoffe des Seminalplasma wie Superoxid- Dismutase, Vitamin C, Zink, Albumin, Transferrin, u.a. ausgeglichen, die die Oxidation der Spermatozoenmembran weitgehend verhindern (Wolff H., 1995).

Zwar gelten aktivierte Neutrophile als Hauptquelle der im Ejakulat nachgewiesenen ROS, jedoch sind auch die Spermatozoen in der Lage, Sauerstoffradikale zumindest in geringen Mengen selbst zu bilden (Saleh, R.A. et al., 2002). In den Untersuchungen von Novotny J. und Oborna I. (2003) waren Ejakulate, in denen Leukozyten nachgewiesen wurden, meist ROS positiv, jedoch zeigten auch Leukozyten- freie Proben erhöhte ROS- Konzentrationen. Die höchsten ROS- Werte wurden sogar in zwei Ejakulaten entdeckt, die keine Leukozyten enthielten. Besonders unreife oder defekte Spermien mit Zytoplasmaresten scheinen nicht unwesentlich an der Produktion von Sauerstoffradikalen beteiligt (Baker M.A. et al., 2003).

Während die ROS- Produktion der Granulozyten erst nach Anregung durch einen geeigneten Stimulus einsetzt, gelang Vernet P. et al. (2001) der Nachweis, dass die Spermatozoen von Ratten kontinuierlich geringe Mengen ROS bilden, um die Signalübertragungskaskade, die zur Kapazitation führt, in Gang zu halten.

Die meisten Autoren sind der Ansicht, dass sich ROS negativ auf bestimmte Ejakulatparameter wie beispielsweise die Motilität der Spermien, auswirken können, wenn die Schutzfunktion des Seminalplasmas fehlt oder ungenügend vorhanden ist (Ochsendorf F.R., 1998). Ein Grenzwert kann allerdings nicht angegeben werden. Dabei scheint der oxidative Stress in den häufigsten Fällen eher durch vermehrte ROS- Produktion als durch reduzierte antioxidative

Kapazität des Seminalplasmas zustande zu kommen (Novotny J., Oborna I., 2003).

Jedoch gibt es anderslautende Meinungen, die den Sauerstoffradikalen eine wesentliche Aufgabe bei der Kapazitation zusprechen. (Griveau J.F. et al., 1994).

Möglicherweise entscheiden aber Art und relative Menge der ROS (Armstrong J.S., 2002), ob vermehrt positive oder negative Effekte auf die Ejakulatparameter zum Tragen kommen. Auch der Zeitpunkt, zu dem die Akrosomreaktion stattfindet, scheint entscheidend (Hsu P.C. et al., 1999).

Weiterhin können chronische Krankheiten, Alter, Toxine und Infektionen nach Sikka S.C. (2001) die antioxidative Kapazität des Seminalplasmas reduzieren und somit dessen Schutzfunktion schwächen. Wahrscheinlich entscheiden also auch interindividuelle Differenzen über die Toxizität der ROS.

Neben ROS werden von aktivierten Granulozyten weitere, für die Spermienfunktion potentiell schädliche Substanzen freigesetzt. So konnten einige Autoren einen negativen Einfluss gewisser Zytokine wie IFN γ und TNF α , aber auch IL-6 bzw. IL-8 nachweisen (Wolff H. 1995). Weiterhin setzen Neutrophile bei Aktivierung ein proteolytisches Enzym, Elastase, frei. Dieses kann jedoch von Proteaseinhibitor und Makroglobulin α_2 im Seminalplasma inaktiviert werden.

1.4. Antigene Strukturen

In diesem Kapitel werden die Strukturen auf der Zellmembran, die von den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erkannt werden, näher charakterisiert.

Antigene Struktur	CD45	CD53
Andere Bezeichnung	T200; Ly-5 (Ledbetter et al. 1988)	
Molekulare Masse	180- 220 kDa (Lokeshwar, Bourguignon 1992)	35- 42 kDa (Angelisova et al. 1990)
Familie	Protein-Tyrosin-Phosphatase	Tetraspanine (Puls et al. 2002)
Vorkommen	Kernhaltige Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Herminston et al. 2002) Downregulation auf Plasmazellen (Justement 2001)	Alle peripheren Leukozyten (Puls et al. 2002) Mesangiumzellen (Yunta et al. 2002)
Struktur	Wahrscheinlich Dimer, Dimerisierung könnte Regulation von CD45 bewirken (Herminston et al. 2002) Extrazelluläre Region stark glykosyliert, unterscheidet sich bei verschiedenen Isoformen, einzelne Transmembrandomäne und grosse zytoplasmatische Region mit Phosphataseaktivität (Lokeshwar, Bourguignon 1992)	Glykoprotein mit kurzem intrazytoplasmatischem Ende (Engering, Pieters 2001), vier trans-membranen Domänen mit polaren Resten, grossem, glykosyliertem (Maecker et al. 1997) und kleinem extrazellulären Loop (Hernandez-Torres 2001)
Funktion	Dephosphorylierung von verschiedenen Kinasen (Src-Familie, Januskinasen) (Penninger et al. 2001) Intrazellulärer Calcium- Anstieg durch Antikörper-Bindung (Spertini et al. 2004) Modulation von Signalen der Antigen-, Integrin- und Zytokinrezeptoren Regulation der Sensitivitätsschwelle für externe Stimuli (Herminston et al. 2003) Positiver oder negativer Regulator je nach Zellart und Entwicklungsstadium (Alexander 2000) Liganden für extrazelluläre Region noch nicht identifiziert (Herminston et al. 2002)	Antikörper- Bindung führt zu intrazellulärem Calcium- Anstieg in B-Zellen und Monozyten (Hernandez-Torres 2001) CD53 beeinflusst Zellproliferation positiv oder negativ je nach verwendetem Antikörper, induziert Zelladhäsionen (Yunta et al. 2002) bei Makrophagen von Ratten vermehrte Freisetzung von Stickoxid (Maecker et al. 1997) Physiologischer Ligand und genaue Wirkungsweise noch nicht bekannt (Yunta et al. 2002)
Besonderes	Multiple Isoformen (mindestens 8) entstehen durch alternatives Splicen (Arendt, Ostergaard 1997) Isoformen sind spezifisch für Zelltyp, Aktivierungs- und Differenzierungsstadium (Wallace et al. 1992)	Tetraspanine assoziieren mit anderen Tetraspaninen, Integrinen, Corezeptormolekülen (Maecker et al. 1997) Mangel an CD53 führt zu wiederholten heterogenen Infektionen verursacht durch Bakterien, Viren oder Pilzen (Mollinedo et al. 1997) CD53 wird auf aktivierten Zellen hochreguliert (Maecker et al. 1997)

Tab. 1.2: Beschreibung der Antigene

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD13	CD15
Andere Bezeichnung	Aminopeptidase N	Lewis X 3-Fucosyl-N-Acetylaktosamin
Molekulare Masse	150- 240 kDa, verschiedene Formen auf den unterschiedlichen Zelltypen (Curnis et al. 2002)	Epitop auf 105 bzw. 165 kDa Glykoproteinen (Nakayama et al. 2001)
Familie	Membran- Metalloprotease	
Vorkommen	Granulozyten, Monozyten Makrophagen, einige T- Lymphozyten (Kehlen et al.2003), Synapsen (Ashmun, Look 1990), Epithel der prox. Nierentubuli, des Darms, der Gallengänge, Fibroblasten (Curnis et al. 2002), Prostata, Ductuli efferentes des Hodens (Huang et al. 1997) Endothel (Kenji et al. 2000)	Granulozyten, Monozyten, Nierenzellen, Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, Gliazellen des ZNS, verschiedene Tumore (Nakayama et al. 2001; Paganuzzi et al. 2003) Spermatozoen (D' Cruz et al. 1997), Zona pellucida der Eizelle (Mori et al. 2000)
Struktur	Größeres extrazelluläres Segment, das Zinkionen gebunden hat (enthält die katalytische Aktivität des Enzyms), transmembraner Bereich, kleine intrazelluläre Region mit N-terminalem Ende Häufig lagern sich zwei Proteine zu einer dimeren Struktur zusammen (Riemann et al. 1999)	Verzweigtes Pentasaccharid
Funktion	Enzym, das Aminosäuren mit neutralen Seitenketten von Proteinen spaltet (Riemann et al. 1999), dadurch vermutlich Aktivierung oder Inaktivierung von Peptiden (Bhagwat et al. 2001) Antikörper- Bindung an CD13 führt zu zweiphasiger Calcium- Erhöhung und Phosphorylierung intrazytoplasmatischer Kinasen (Huschak et al. 2003) Involviert in Zelladhäsion, Tumordinvasion, Metastasierung, Antigenprozessierung (Bhagwat et al. 2001), Motilität (Hashida et al. 2002), Zellwachstum (Lohn et al. 2002), Angiogenese, Antigenprozessierung (Kehlen et al. 2003)	Adhäsionsmolekül Involviert in Interaktion von Leukozyten mit Thrombozyten über P- Selektin und Endothelzellen über E- Selektin (Rauch et al. 2003) Evtl. beteiligt an Interaktion zwischen Spermien und Oozyte (Mori E. et al. 2000) bzw. Spermien und Epithel der Tuba uterina (Yoshitani et al.2001)
Besonderes	Antikörper- Bindung führt zu vermehrter Produktion von IL-8 (Huschak et al. 2003) Expression von CD13 wird erhöht durch LPS (Huschak et al. 2003), Hypoxie (Bhagwat et al. 2001), IL-3 (Braun et al. 2003), IL-4 und IFN γ (Kenij et al. 2000) Existiert auch gelöst im Plasma (Curnis et al. 2002) und Seminalplasma (Huang et al. 1997)	CD15 an Glykolipide oder Glykoproteine gebunden (Nakayama et al. 2001) Man findet ausserdem silalierte Form (sLewis x)- membrangebunden oder im Plasma gelöst (Paganuzzi et al. 2003)

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD14	CD3
Andere Bezeichnung		T3
Molekulare Masse	55 kDa (Uehara et al. 2003)	16- 28 kDa je Kette (Novokastras Katalog)
Familie		Immunoglobulinsuperfamilie (Weissman et al. 1988)
Vorkommen	Monozyten/Makrophagen, Granulozyten (Hailmann et al. 1994), B-Zellen (Ziegler- Heitbrock 1994), Hepatozyten (Pan et al. 2000), Spermatozoen (Harris et al. 2001)	T- Lymphozyten
Struktur	Glykosyl- Phosphatidylinositol (GPI)- verankertes Glykoprotein (Poussin et al. 1998)	Komplex aus 5 Polypeptidketten (gamma, delta, epsilon, zeta und eta Kette) (Novokastras Katalog) Extrazelluläre Region, Transmembrandomäne und intrazytoplasmatischer Anteil mit ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) (Janeway et al. 2001)
Funktion	Rezeptor für den Komplex aus LBP und LPS der gramnegativen Bakterien und für Peptidoglykane der grampositiven Bakterien (Gupta et al. 1996) Ligandbindung führt zu Transkription verschiedener Gene, u.a. inflammatorischer Zytokine (Compton et al. 2003), zu Zellaktivierung sowie zur Makropinozytose von LPS, das in Granula unschädlich gemacht wird. (Poussin et al. 1998) Interaktion mit apoptotischen Zellen fördert deren Phagozytose (Devitt et al. 1998)	Notwendig für die Expression des T- Zell- Rezeptors (TCR) an der Zelloberfläche und die Übertragung der Signale (Janeway et al. 2001)
Besonderes	Es existieren zwei lösliche Formen (sCD14) mit und ohne GPI- Verknüpfung (Harris et al. 2001) Lösliche Form in Serum, Urin (Pan et al. 2000), Speichel (Uehara et al. 2003), Seminalplasma, Liquor, Muttermilch, Amnionflüssigkeit (Harris et al. 2001), Vaginalsekret (Fichorova et al. 2002) sCD14 kann LPS binden und über TLR4 CD14- negative und -positive Zellen aktivieren (Harris et al. 2001) und die Phagozytose der Bakterien einleiten Monozyten, Hepatozyten, Speicheldrüsen und Brustdrüse können sCD14 freisetzen (Filipp et al. 2001, Uehara et al. 2003, Labeta et al. 2000) Membrangebundene und lösliche Form möglicherweise Lipid- Transportprotein (Pan et al. 2000)	Mit T- Zell- Rezeptor assoziiert (Janeway et al. 2001)

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD4	CD8
Andere Bezeichnung	T4	T8
Molekulare Masse	55 kDa (Crocker et al. 1987)	33- 34 kDa (Giblin et al. 1989)
Familie	Typ I Integral- Glykoprotein Immunglobulinsuperfamilie	Glykoprotein
Vorkommen	Reife T- Zellen, Thymozyten, Makrophagen, Langerhanszellen, Neuronen, Gliazellen (http://www.bio.davidson.edu) Monozyten, Spermatozoen (Lavitrano et al. 1997)	T- Zellen, v.a. zytotoxische/ Suppressorzellen, Natürliche Killerzellen (Giblin et al. 1989), Thymozyten (Shiue et al. 1988)
Struktur	Vier extrazelluläre Untereinheiten, Transmembranregion, kurzem zytoplasmatischem Rest, der mit Tyrosinkinase (p56lck) assoziiert ist (http://www.bio.davidson.edu)	Extrazelluläre Region, transmembrane Domäne, zytoplasmatischer Bereich, der Tyrosinkinase (p56lck) gebunden hat (de la Calle- Martin et al. 2001) Lösliche und membrangebundene Form $\alpha\alpha$ - Homodimer oder $\alpha\beta$ - Heterodimer, disulfidverknüpft, auch grössere Formen (Tetramer) (Giblin et al. 1989)
Funktion	Corezeptor für TCR Interaktion mit MHC II Vermindert die Menge der zur Zellaktivierung benötigten Antigene Kann Antigen auch TCR- unabhängig binden (http://www.bio.davidson.edu)	Corezeptor für TCR zur Erkennung von durch MHC I präsentierte Peptide vereinfacht Zell- Zell- Interaktion von T- Zellen, fremde Antigene in Assoziation mit MHC I zu erkennen verstärkt T- Zellaktivierung (Shiue et al. 1988) erhöhte die Empfindlichkeit der T- Zell für Antigene (Janeway et al. 02)
Besonderes	Vermittelt T- Zellinfektion durch HIV durch Interaktion von CD4 mit dem Hüllprotein gp120 (Ryu et al. 94)	Wird bei T- Zell- Triggerung phosphoryliert Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Formen Lösliche und membrangebundene Form sowohl in aktivierten als auch ruhenden peripheren Lymphozyten (Giblin et al. 1989)

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD19	CD22
Andere Bezeichnung		
Molekulare Masse	95 kDa (Janeway et al. 2001)	130- 140 kDa (Fujimoto et al. 1999)
Familie	Immunglobulinsuperfamilie (Fujimoto et al. 2002)	Immunglobulin
Vorkommen	B- Lymphozyten, follikuläre dendritische Zellen	B- Lymphozyten, Basophilen (Han et al. 1999), primäre T- Zellen (Sathish et al. 2004)
Struktur	Zwei extrazelluläre Regionen ähneln Immunglobulinen, transmembraner Anteil, zytoplasmatische Domäne aus 240 Aminosäuren (Zhou et al. 1991), die Tyrosinkinasen bindet (Janeway et al. 2001)	Heterodimere Struktur zweier Glykoproteinketten (Schwartz- Albiez et al. 1991) Zytoplasmatischer Anteil mit ITIMs, die inhibitorisch wirkende Kinasen binden (Fujimoto et al. 2002)
Funktion	Nach Antigenstimulation werden Tyrosinreste des zytoplasmatischen Teils von CD19 phosphoryliert (Janeway et al. 2001), Proteine können sich anlagern (Wang et al. 2002) und über verschiedene Kinasen (u.a. der Src- Familie, Tedder et al. 2000) eine Signalkaskade in Gang setzten, die zur Calcium- Erhöhung führt. (Fujimoto et al. 2002) Dadurch Verstärkung der Signale, die von B- Zell- Rezeptoren nach Antigenbindung initiiert werden, Induktion der B-Zellantwort (Fujimoto et al. 2002)	Adhäsionsmolekül bindet an Sialylsäure- tragende Glykoproteine (Collins et al. 2004) Schwächt intrazelluläre Calcium- Erhöhung ab (Fujimoto et al. 2002), indem es Calcium- Ausfluss verstärkt und dadurch das Signal zur B- Zell- Aktivierung inhibiert (Chen et al. 2004) Funktionell eng mit CD19 verknüpft, gegenregulatorisch an der Signalübermittlung beteiligt (Fujimoto et al. 1999) Möglicherweise an der Interaktion zwischen B- Zellen beteiligt (Otero, Rickert 2003)
Besonderes	Bildet mit CD81 und CD21 und Leu-13 einen Corezeptor- Komplex (Cherukuri et al. 2004) Niedrige Expression von CD19: verminderte B- Zellreaktion auf Antigenstimulation bei Mäusen Überexpression von CD19: verstärkte Immunantwort bis hin zur Bildung von Autoantikörpern (Fujimoto et al. 2002)	Existiert sowohl im Zytoplasma als auch membrangebunden (Schwartz- Albiez et al. 1991) Nach B- Zell- Differenzierung oder -Aktivierung wird Expression gestoppt (Pezzutto et al. 1988)

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD16	CD56
Andere Bezeichnung	FcγRIII	N-CAM (neurales Zelladhäsionsmolekül), Leu-19 (Lanier et al. 1989)
Molekulare Masse	50- 80 kDa (Janeway et al. 2001)	175- 185 kDa (Lanier et al. 1989)
Familie	Immunglobulin (Janeway et al. 2001)	Immunglobulinsuperfamilie (Lanier et al. 1991)
Vorkommen	Natürliche Killerzellen und aktivierte Makrophagen (Transmembranform von CD16), Neutrophile (GPI- verknüpfte Form), (Harrison et al. 1991), einige T- Zellen (Uciechowski et al. 1992)	Natürliche Killerzellen, Neuronen, Astrozyten, Schwannzellen und einige aktivierte T- Lymphozyten (Produktkatalog Novocastra)
Struktur	Transmembran- oder GPI- verknüpfte Form (Harrison et al. 1991)	Durch transmembranes Peptid im Membran verankert, auch Verankerung über Phosphatidylinositol möglich (Lanier et al. 1989)
Funktion	Rezeptor für den Fc- Teil der IgG Antikörper (Delves, Roitt 1998) Kreuzvernetzung führt zu Calcium- Freisetzung und Hydrolyse von Membraninositiden CD16 ermöglicht Phagozytose und antikörperabhängige gezielte zytotoxische Aktivität gegen Zellen, die IgG markiert wurden (Gemsa et al. 1997)	Unklar, evtl. Adhäsion der Natürlichen Killerzelle an die Zielzelle (Lanier et al. 1989)
Besonderes	Natürliche Killerzellen können lösliche Form spontan freisetzen (Harrison et al. 1991) Lösliche Form in Seminalplasma vorhanden (Thaler et al. 1994)	Es existieren verschiedene Isoformen durch unterschiedliches Splicen und posttranslationale Modifikationen (Lanier et al. 1989)

Fortsetzung Tab. 1.2

Antigene Struktur	CD69	CD71
Andere Bezeichnung	Leu-23, MLR-3, EA-1 (Testi et al. 1990)	Transferrin- Rezeptor
Molekulare Masse	55- 65 kDa, bestehend aus zwei verschiedenen glykosylierten Untereinheiten mit je 28- 32 kDA Molekulargewicht (Testi et al. 1990)	180- 190 kDa, bestehend aus zwei identischen, über Disulfid- Brücken verknüpften Untereinheiten mit je 90-95kDa Molekulargewicht (Do et al. 1990)
Familie	C-Typ- Lektin- Superfamilie (Puls et al. 2002)	Typ II Membran- Glykoprotein (Mahadevon, Saldanha 1999)
Vorkommen	Aktivierte Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile, Monozyten, Thrombozyten Langerhanszellen (De Maria et al. 1994) Basophile (Yoshimura et al. 2002)	Wahrscheinlich ubiquitär auf allen Zellen, besonders stark auf metabolisch aktiven oder proliferierenden Zellen (Ponka, Lok 1999)
Struktur	Typ II Transmembran- Glykoprotein Disulfid- verknüpfter Homodimer (Walsh et al. 1996)	Homodimer (Kanayasu- Toyoda et al. 1999) Kurzer zytoplasmatischer und transmembraner Bereich, grosse extrazelluläre Region Während Biosynthese stark modifiziert (Do et al. 1990)
Funktion	Noch nicht genau geklärt, Ligand noch nicht bekannt (Sancho et al. 2005) Frühes Aktivierungsantigen (Sancho et al. 2005) Erhöht intrazelluläre Calcium- Konzentration (Walsh et al. 1996) Bindung an CD69 führt zu Apoptose von Eosinophilen (Dallaire et al. 2003), Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, Zytokinfreisetzung, Degranulation und Proliferation bei Lymphozyten (Testi et al. 1990)	Eisenaufnahme durch Endozytose von Transferrin (Ned et al. 2003) Wichtig bei Zellproliferation (Kanayasu- Toyoda et al. 1999)
Besonderes	Möglicherweise in intrazellulären Pools gespeichert und nach Stimulation auf Oberfläche exprimiert (Nopp et al. 2000)	Rückgang von CD71 bei Neutrophilen während der Reife (Kanayasu- Toyoda et al. 1999) Geringe Mengen löslichen CD71 im Serum, vermutlich von Retikulozyten während der Reifung zu Erythrozyten freigesetzt (Ponka, Lok 1999) Lösliches CD71 im Seminalplasma (Zalata et al. 1996)

1.5 Fragestellung

Die Untersuchung des Ejakulates auf Leukozyten gehört nach WHO Kriterien zur Routinediagnostik jedes andrologischen Labors. Große Arbeitsintensität und hohe Kosten sind der Grund dafür, dass sich die immunhistochemische Methode, die als Goldstandard gilt, zur Bestimmung der Leukozyten im Laboralltag bisher nicht gegen die Peroxidasefärbung durchsetzen konnte.

Da sich mit der Peroxidase- Reaktion lediglich die Granulozyten anfärben, die Monozyten und Lymphozyten jedoch nicht zur Darstellung kommen, wird die Leukozytenzahl mit dieser Methode ungenau gemessen.

Die Alternative, Leukozyten mit speziellen Antikörpern flowzytometrisch zu bestimmen, wie dies in der Klinischen Chemie häufig praktiziert wird, ist im andrologischen Labor nicht üblich.

In verschiedenen Publikationen wird die Anwendung einzelner monoklonaler Antikörper zur flowzytometrischen Leukozytendiagnostik im Ejakulat beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es nun,

- eine Reihe monoklonaler Antikörper, die zur flowzytometrischen Differenzierung und Bestimmung der Aktivität von Leukozyten im Blut zum Einsatz kommen, auf ihre Eignung zur Anwendung im Ejakulat zu überprüfen
- und somit eine alternative Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Leukozyten im Ejakulat weiterzuentwickeln, die alle Subpopulationen erfassen kann und die Peroxidasemethode zur Auszählung der Leukozyten ersetzt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsgut

2.1.1 Ejakulat

Die in dieser Arbeit verwendeten Ejakulate stammten sowohl von Spendern als auch von Patienten, die zwischen Oktober 2000 und Dezember 2001 die andrologische Sprechstunde des medizinischen Zentrums für Hautkrankheiten der Philipps-Universität Marburg aufsuchten.

Die verflüssigten Ejakulate wurden nach WHO- Richtlinien aufgearbeitet und untersucht. Nur Proben, die bei der routinemäßig durchgeführten Peroxidasereaktion durch Leukozytenzahlen von mehr als 1,0 Millionen Granulozyten pro Milliliter auffielen, wurden im Rahmen dieser Arbeit innerhalb von 4 Stunden weiter untersucht.

Die Auswertung erfolgte aus datenschutzrechtlichen Gründen anonym.

2.1.2 Blut

In den Vorversuchen und der Messreihe, bei der Blutleukozyten angefärbt wurden, wurden Blutproben von klinisch gesunden Probanden verwendet, die in EDTA- Röhrchen gewonnen wurden und der Kontrolle dienten.

2.2 Antikörper

Die in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Antikörper	Klon	Farbstoff	Hersteller
CD 3	Clone Cris-7	FITC	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 4	clone7E14	PE	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 8	clone17D4	PE	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 13	clone TÜK 1	TC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD 14	Clone FWKW-1	FITC	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 15	clone MCS- 1	FITC	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 16	clone B-E16	PE	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 19	clone SJ25-C1	FITC	Cytognos, Salamanca, Spain
CD 22	clone RFB4	R-PE	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD 45		PE	PHARMINGEN
CD 53		FITC	PHARMINGEN
CD 56	clone MEM-188	R-PE	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD 69	clone CH/4	TC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD 71	clone T56/14	FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper zur Markierung der Leukozyten

2.3 Aufarbeitung der Ejakulate

2.3.1 Vorversuch A

In 3 Versuchsreihen wurden 100 µl Blut eines klinisch gesunden Probanden mit jeweils 10µl CD3, CD45, CD53 oder einer Kombination zweier Antikörper (CD3/45; CD45/53) versetzt (Tab. 2.2) und 20 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden wie in den folgenden Versuchen große Kolbenhubpipetten (Eppendorf) mit Einmalspitzen sowie für das FACScan geeignete Röhrchen der Marke Falcon Tubes (Becton Dickinson) verwendet.

Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden anschließend 2 ml des Lysereagens Quicklysis (medac) zu jeder Probe gegeben. Nach 10 Minuten wurde zu der Hälfte der Proben 100µl Ejakulat hinzugefügt, um den Einfluß der Spermatozoen auf die flowzytometrische Messung beurteilen zu können.

Hierzu wurden Ejakulate mit in der Routineanalyse unauffälligen Parametern ausgewählt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 600g in einer Tischzentrifuge von Hettich Universal zentrifugiert. Der Überstand jedes Röhrchens wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, das Pellet in 1ml PBS- Puffer resuspendiert. Bis zur Messung am Flowzytometer wurden die Proben im Dunkeln aufbewahrt.

Blutleukozyten	keine Ak	CD45	CD3	CD53	CD3+CD45	CD45+CD53
Blutleukozyten+Ejakulat	keine Ak	CD45	CD3	CD53	CD3+CD45	CD45+CD53
Ejakulat						CD45+CD53

Tab. 2.2: Färbeschema der Vorversuche A und B

2.3.2 Vorversuch B

Um die Ejakulatproben zu reinigen, wurden 10 Versuche durchgeführt, die ein bis zwei Waschschrte mit PBS oder SPM beinhalteten. SPM enthält neben Earle's gepufferter Salzlösung einen synthetischen Serumersatz sowie humanes Serumalbumin und Antibiotika und dient nach Entfernung des Seminalplasmas der Vitalitätserhaltung von Spermatozoen oder Oozyten.

Es wurden jeweils 100µl Ejakulat mit erhöhter Leukozytenzahl in der Peroxidasereaktion mit 2ml PBS oder SPM versetzt und 10 min bei 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, bevor die Färbung mit oben genannten Antikörpern durchgeführt wurde. Nach 20 minütiger Inkubationszeit wurden 2ml PBS hinzugefügt und erneut 10 min bei 400g zentrifugiert.

Desweiteren wurden 5 Ejakulate durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit 30% Percoll aufgereinigt.

Percoll ist ein kommerziell erhältliches Produkt, das aus 15- 30mm großen Silikatpartikeln besteht, die mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet sind.

1ml 30% Percoll Medium wurde in ein Kunststoffröhrchen pipettiert und mit 100µl Nativejakulat überschichtet. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 350g wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Der weitere Versuchsvorgang ist im oberen Abschnitt beschrieben.

2.3.3 Antikörperfärbung mit CD 69/ CD 71 als Aktivitätsnachweis

In 4 Versuchen wurden 50µl Ejakulat nach zwei Waschschritten mit SPM mit je 10µl CD69 und CD71 angefärbt.

2.3.4 Versuchsreihe

2.3.4.1 Blut

100µl Blut wurden mit je 10µl der unten angegebenen Antikörper angefärbt. Nach 20 minütiger Inkubation wurden 2ml 1:10 verdünntes Lysereagenz (PharmlyseTM Ammonium Chloride Lysing Reagent BD PharMingen) zugegeben.

Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 200g, bevor der Überstand abpipettiert, das Pellet in 2ml PBS resuspendiert und erneut gewaschen wurde.

2.3.4.2 Ejakulat

Die Nativejakulate wurden durch Verdünnung mit PBS auf eine Konzentration von 10^6 Leukozyten pro Milliliter eingestellt, um den Einfluß unterschiedlicher Leukozytenkonzentrationen in den folgenden Versuchsschritten auszugleichen. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte vor der Verdünnung während der Routinediagnostik mittels Peroxidase- Färbung.

Je 50µl der Probe wurden auf Kunststoffröhrchen verteilt und zwei Waschvorgängen mit 2ml SPM unterzogen. Die Zentrifugation bei 400g dauerte 10 min. Nun wurden die Proben mit je 10µl Antikörper nach unten genanntem Schema angefärbt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 2ml PBS folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 400g, um nicht gebundene, fluoreszenzmarkierte Antikörper zu entfernen.

Antikörperkombination	Nachweis für:
Keine Antikörper	Negativkontrolle
CD45/CD53	Pan- Leukozyten
CD13/CD53	Granulozyten
CD15/CD45	Granulozyten
CD14/CD45	Monozyten
CD3/CD45	T- Lymphozyten
CD19/CD22/CD45	B- Lymphozyten
CD3/CD16/CD56/CD45	Natürliche Killerzellen

Tab. 2.3: Färbeschema der Versuchsreihe für Blut und Ejakulat

2.4 Flowzytometrische Auswertung

Zur flowzytometrischen Untersuchung wurde ein FACScan von Becton Dickinson verwendet, welches als Lichtquelle einen luftgekühlten Argonlaser besitzt, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm aussendet.

Das Gerät ist in der Lage, neben FSC und SSC drei verschiedene Fluoreszenzsignale aufzuzeichnen. FL1 ist für die Messung von FITC (Emissionsmaximum bei 530 nm) geeignet. FL2 wird für Fluoreszenzen von 585 nm Wellenlänge verwendet und FL3 ist auf Farbstoffe abgestimmt, deren Emissionsspektren über 650 nm Wellenlänge liegen, wie zum Beispiel Tricolor und Propidiumiodid.

Die Proben, die in speziellen, für das FACScan erforderlichen Küvetten aufgearbeitet worden waren, wurden zum Schutz gegen Licht in einem Styroporbehälter umgehend zum Messplatz transportiert. Vor den einzelnen Messungen wurde das Flowzytometer mit Flüssigkeit solange gespült, bis sich keine Fluoreszenzsignale mehr nachweisen ließen. Die Probenröhrchen wurden nacheinander aus dem Behälter entnommen, geschüttelt und in das FACScan eingesetzt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen erfasst. Um Verunreinigungen und Spermatozoen weitgehend auszuschließen, wurden Gates in FSC und SSC festgelegt (Live- Gating)(Raffael A., 1988). Dabei wird eine elektronische Schwelle gesetzt, die verhindert, dass darunter liegende Signale aufgezeichnet werden (Longobardi G.A., 1992).

Streu- und Fluoreszenzlichtsignale wurden auf den zugehörigen Steuerrechner (Hewlett Packard) übertragen. Zur Steuerung der Messung sowie zur Aquisition und Speicherung der Daten auf einer 3,5 Zoll Diskette wurde das Programmpaket 'FACScan' von Becton Dickinson verwendet, welches auf dem Betriebssystem HP- Pascal von Hewlett Packard basiert. Zur weiteren Bearbeitung am PC stand das Programm WinMDI Version 2.8 zur Verfügung, welches im Internet kostenlos unter <http://facs.scripps.edu> erhältlich ist. Zuvor mussten die mit dem HP- Rechner geschriebenen Dateien mit Hilfe eines von T. Schüller aus Mühlheim (1996) entwickelten Konvertierungsprogramms auf das Betriebssystem MS- DOS umgeschrieben werden.

Zur Auswertung der Messungen bieten sich verschiedene Möglichkeiten der graphischen Darstellung an.

Die einfachste Form ist das Histogramm, welches, für jeden Parameter separat, die Anzahl der Zellen in den 1024 Kanälen zeigt (Raffael A., 1988). Um zwei Merkmale einer Zelle in Beziehung zu setzen, eignen sich die zweidimensionalen Darstellungen. Dazu gehört der am meisten verwendete, sogenannte Dotplot (Raffael A., 1988). Jede analysierte Zelle wird als Punkt in diesem Koordinatensystem abgebildet (Hastka, 1997). Die Dichte der Punktwolke entspricht der Häufigkeitsverteilung der Zellen. Eine dritte Möglichkeit ist die Kontourlinien- Darstellung, bei der, ähnlich einer topographischen Landkarte, die Kanäle mit gleicher Zellzahl durch eine Linie miteinander verbunden sind (Raffael A., 1988). Die Analyse der Daten kann zusätzlich durch Setzen eines Filters vereinfacht werden. Bei diesem Vorgang, auch Gating genannt, wird im Histogramm oder Dotplot eine Begrenzung eingeführt. Nur die in diesem Feld enthaltenen Zellen werden dann in einer weiteren Parameterdarstellung berücksichtigt (Raffael A., 1988). Zusätzlich ermöglicht das Setzen von Gates oder Markern die Bestimmung der Zellzahl als absolute Zahl oder als Prozentanteil aller im Diagramm eingetragenen Zellen.

Das FACScan Flowzytometer wurde regelmäßig mit CaliBrite Beads (Becton Dickinson) kalibriert. Dies sind kleine Kügelchen aus Polyethylen, die der Prüfung von Kompensation und Sensitivität dienen (Agrawal Y.P. et al., 1991).

2.5. Mikroskopische Kontrolle

Eine mikroskopischen Kontrolle der Antikörperfärbung bei Leukozyten des peripheren Blutes erfolgte durch Herrn Schmitt, Mitarbeiter der Firma Leica, an einem vollautomatisierten Forschungsmikroskop (Leica DM RA2). Die Bilder wurden digitalisiert und auf CD- ROM gespeichert.

2.6 Statistische Auswertung

Aufgrund zu geringer Fallzahlen bei den einzelnen Messreihen ist eine weitere statistische Aufarbeitung der Ergebnisse nicht sinnvoll.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorversuch A

Die Untersuchungen an Blutleukozyten mit oder ohne Beimischung von Ejakulaten ergaben folgende Resultate:

1. Die Leukozyten lassen sich mit den Pan- Leukozytenantikörpern CD45 und CD53 hervorragend anfärben. Auch die Zugabe von Ejakulat beeinflusst das Ergebnis nicht wesentlich. Abb. 3.1 und Abb. 3.2 zeigen den Unterschied zwischen unmarkierten und markierten Leukozyten- Ejakulat- Gemischen.

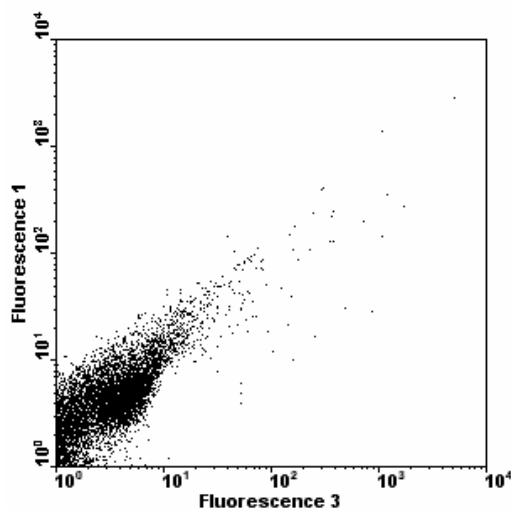


Abb. 3.1: Negativkontrolle

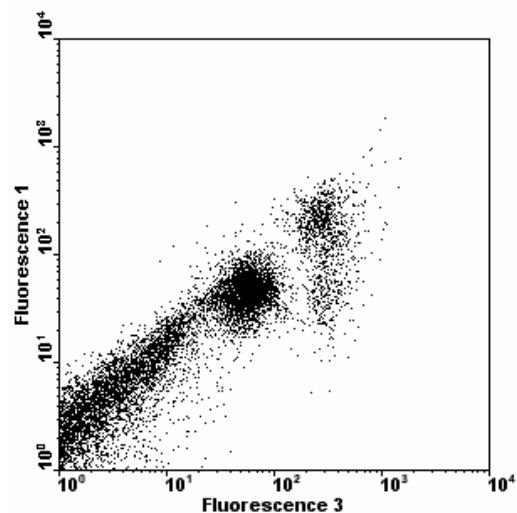


Abb. 3.2: Färbung mit CD45 (FL3) und CD53 (FL1)

2. Mit Hilfe des T-Zell-Markers CD3 läßt sich ein großer Teil der Lymphozyten deutlich von den restlichen Zellen differenzieren.

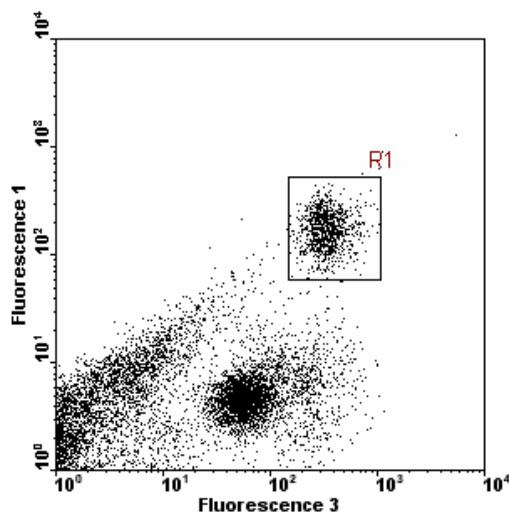


Abb.3.3: T- Zelldifferenzierung mit CD45 (FL3) und CD3 (FL1). R1 zeigt die markierten T-Lymphozyten.

3. Werden gefärbte Proben über 1- 2 Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, werden im Vergleich zu direkt flowzytometrisch ausgewerteten Versuchsreihen keine gleichwertigen Ergebnisse erzielt. Die Grenzen der einzelnen Zellgruppen scheinen undeutlicher.

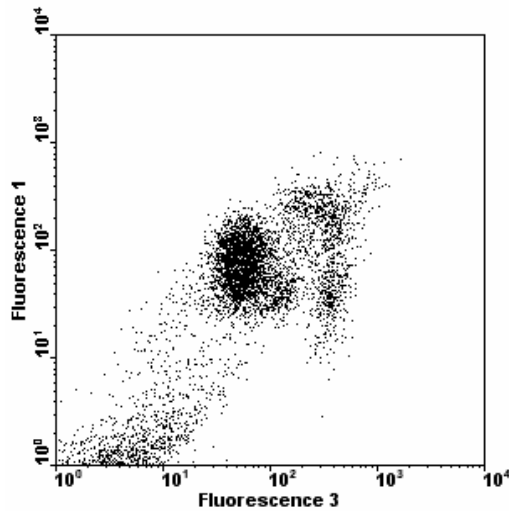


Abb. 3.4: Messung mit CD45 (FL3) und CD53 (FL1) am Tag der Probenaufbereitung

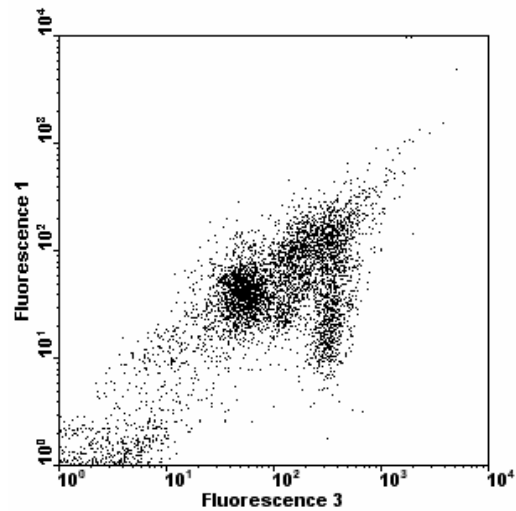


Abb. 3.5: Gleiche Messung nach 2 Tagen, Aufbewahrung bei 4°C.

3.2 Vorversuch B

In den Vorversuchen B zeigten sich die Dotplot Gruppen deutlicher nach zweimaliger Waschung mit SPM als nach nur einem Waschgang bzw. ohne Waschen. Mit der Percoll Aufreinigung ließ sich zwar der Anteil an nichtzellulären Bestandteilen verringern, jedoch standen Aufwand und Ergebnis in keiner Relation, so dass diese Versuchsreihe nicht fortgeführt wurde. Zwischen PBS und SPM war kein deutlicher Unterschied zu erkennen, dennoch wurden die nächsten Versuchsreihen mit zweimaligem Waschen mit SPM angesetzt.

3.3 CD69 / CD71 als Aktivitätsnachweis

Die Färbung der Leukozyten im Ejakulat mit den Aktivierungsmarkern CD69 und CD71 brachte keine eindeutigen Ergebnisse und wurde aus diesem Grund nur an drei Proben durchgeführt. Die Leukozyten konnten nicht von anderen Ejakulatbestandteilen unterschieden werden, eine Differenzierung in die Subpopulationen war nicht möglich.

3.4 Versuchsreihe

3.4.1 CD45/ CD53

Voraussetzung dafür, die Messreihe mit den ausgewählten Antikörpern zur Differenzierung der Leukozyten in die Subpopulationen überhaupt durchführen zu können, war der Nachweis der Funktionstüchtigkeit der beiden Pan- Leukozyten Antikörper CD45 und CD53. Diese Marker wurden daher bereits in den Vorversuchen eingesetzt, wo schon deutlich wurde, dass Leukozyten eine starke Fluoreszenz sowohl in FL1 als auch FL3 aufwiesen. Jedoch schienen auch andere Bestandteile des Ejakulates diese Antikörper zu binden, was besonders bei den Messungen mit CD53 auffiel.

Das Ergebnis der Messung im Blut zeigt eine klare Abtrennung der Leukozyten (Abb.3.6). Die gatedete Punktwolke enthält 56,8% aller Zellen und lässt eine weitere Differenzierung in die 3 Subpopulationen erahnen.

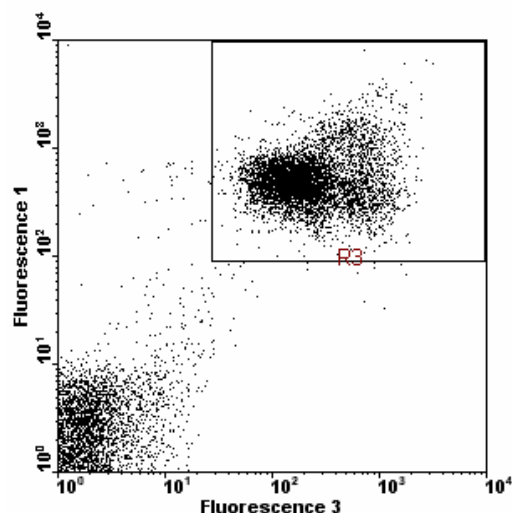


Abb. 3.6: Periphere Leukozyten (R3) nach Färbung mit CD45 (FL3) und CD53 (FL1).

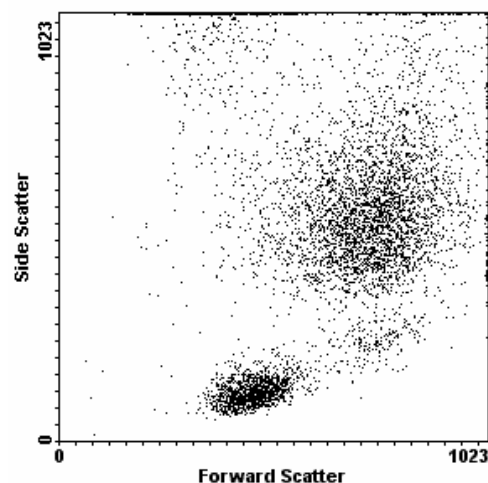


Abb. 3.7.: Darstellung der Messung in FSC/SSC

Zum Vergleich das Ergebnis der Messung einer Leukozytospemie- Probe. Leukozyten grenzen sich auch hier von weiteren Ejakulatbestandteilen ab, der Unterschied ist allerdings nicht so deutlich wie bei der Blutprobe der oberen Abbildung, da andere Zellgruppen ebenfalls eine - wenn auch geringere - Fluoreszenz aufweisen.

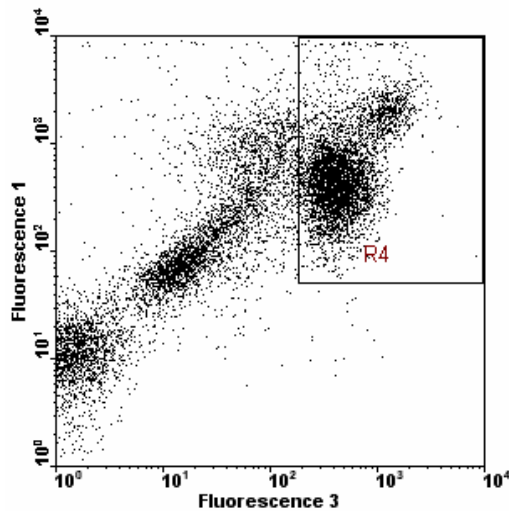


Abb. 3.8: Seminale Leukozyten (R4) nach Färbung mit CD45 (FL3) und CD53 (FL1).

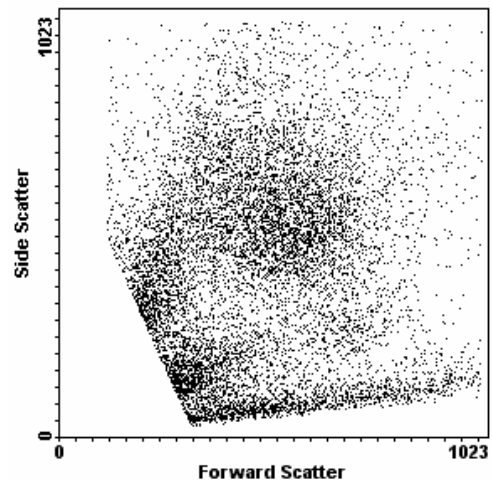


Abb. 3.9: Darstellung der Messung in FSC/SSC

Während im FSC/SSC- Diagramm die Leukozyten- Untergruppen nur undeutlich zu erkennen sind (Abb. 3.9), bereitet die Differenzierung in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nach dem Gaten keine Probleme mehr (Abb.3.10).

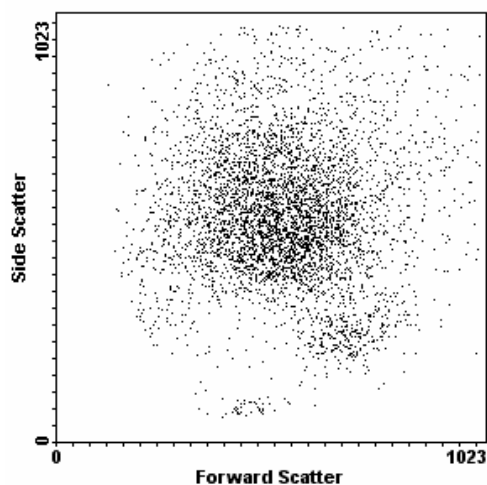


Abb. 3.10: R4- Darstellung in FSC/SSC. Neben seminalen Leukozyten werden auch andere Ejakulatbestandteile abgebildet.

3.4.2 CD13

Die Messung mit dem monoklonalen Antikörper CD13 läßt im Blut eine gute Abgrenzbarkeit der Granulozyten erkennen (R2), die mit 73,0% die größte Gruppe der Leukozyten im Blut stellen. Auch Monozyten (R1) mit einem prozentualen Anteil von 4,6% und Lymphozyten (R3, 22,4%) kann man als gesonderte Populationen unterscheiden.

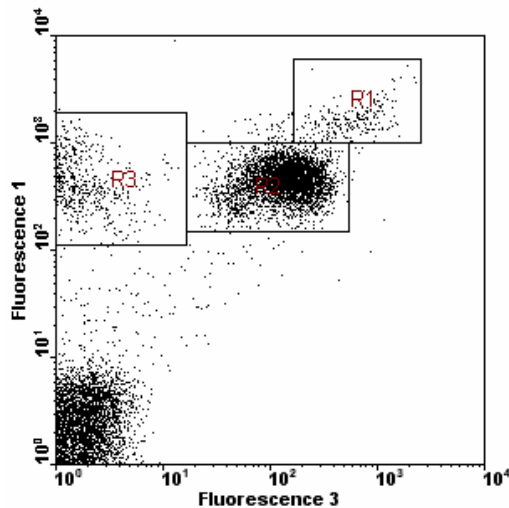


Abb. 3.11: Periphere Leukozyten, markiert mit CD13 (FL3) und CD53 (FL1). R1 Monozyten, R2 Granulozyten, R3 Lymphozyten

Im Ejakulat dagegen ist es schwierig oder in vielen Messungen unmöglich, Monozyten, Granulozyten und andere Ejakulatbestandteile zu differenzieren. In den meisten Messungen kann man daher nur Lymphozyten als eigenständige Population erfassen.

In den beiden Proben, bei denen die Unterscheidung aller drei Subpopulationen möglich war, fanden sich durchschnittlich 83,5% Granulozyten, 15,2% Monozyten und 1,5% Lymphozyten.

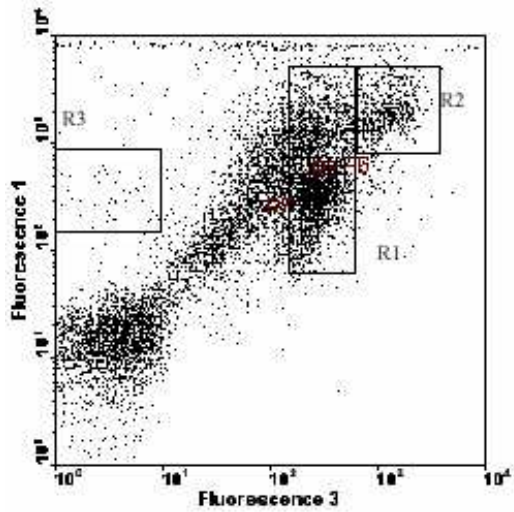


Abb. 3.12: Färbung seminaler Leukozyten mit CD13 (FL3) und CD53 (FL1).

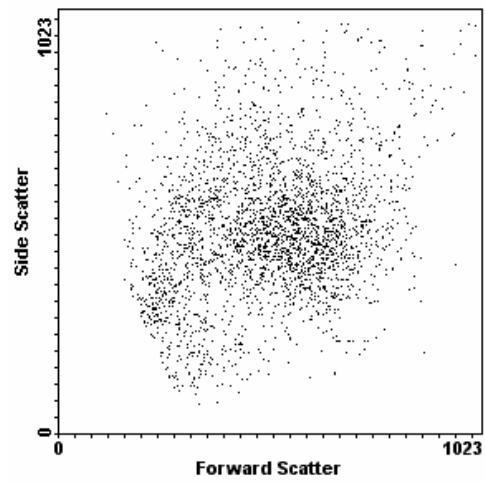


Abb. 3.13: R1- Darstellung der Granulozyten in FSC/SSC.

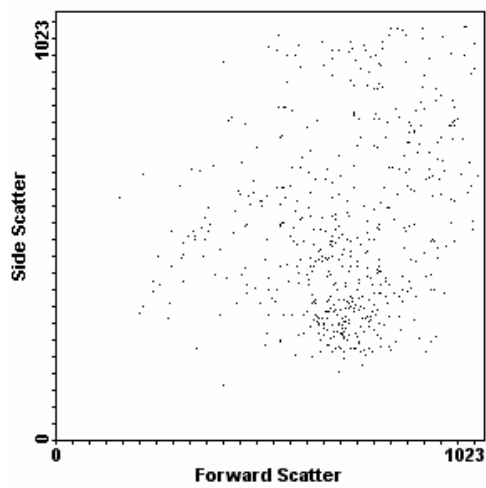


Abb. 3.14: R2- Darstellung der Monozyten in FSC/SSC.

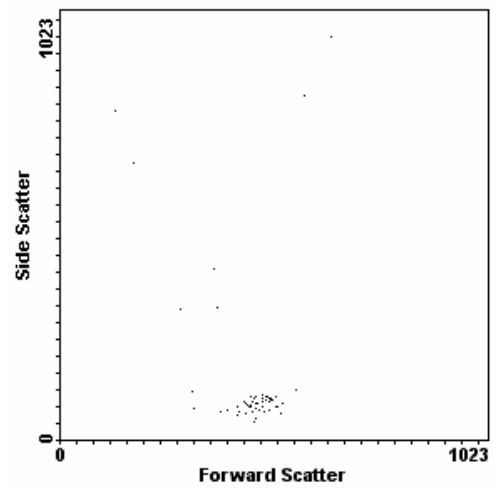


Abb. 3.15: R3- Darstellung der Lymphozyten in FSC/SSC.

3.4.3 CD15

Das folgende Diagramm zeigt eine Antikörper-Färbung von Blutleukozyten mit CD15/ CD45. Deutlich lassen sich die einzelnen Leukozytensubpopulationen abgrenzen. R1 enthält die Granulozyten, die mit 70,0% den größten Anteil ausmachen. Zweitgrößte Leukozytenpopulation sind die Lymphozyten (R3) mit 25,1%. Monozyten (R2) stellen mit nur 4,8% die kleinste Leukozytenfraktion.

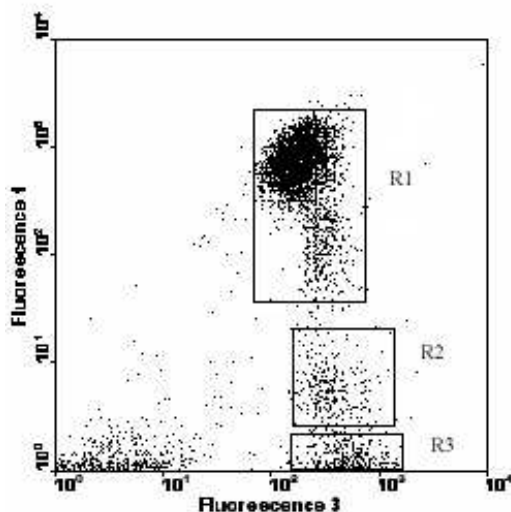


Abb. 3.16: Darstellung der peripheren Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD15 (FL1). R1 Granulozyten, R2 Monozyten, R3 Lymphozyten

In den Ejakulatproben gestaltet sich die Abgrenzung der Granulozyten erheblich schwieriger. Besondere Probleme verursachen dabei die Rundzellen nicht-leukozytischer Genese, die ebenfalls von CD15 angefärbt werden. In 6 Versuchen gelang die Differenzierung. Das Färbeverhalten der einzelnen Subpopulationen ähnelt dem der oben gezeigten Leukozyten im Blut: Granulozyten wie auch andere Rundzellen zeigen starke, Monozyten mäßige und Lymphozyten fast keine Fluoreszenz im FL1 Kanal.

Der Anteil der Granulozyten an den erfassten Zellen schwankt zwischen 48,8 % und 76,1 % mit einem Mittelwert von 62,8%.

Da sich auch die anderen Leukozytensubpopulationen abgrenzen lassen, kann man deren prozentualen Anteil ebenfalls errechnen. Bei Monozyten ergeben sich Werte zwischen 20,9% und 44,7%. Der Mittelwert beträgt 32,5 %. Lymphozyten machen zwischen 1,3 % und 11,4% aller gemessenen Zellen aus, der Mittelwert liegt bei 4,7 %.

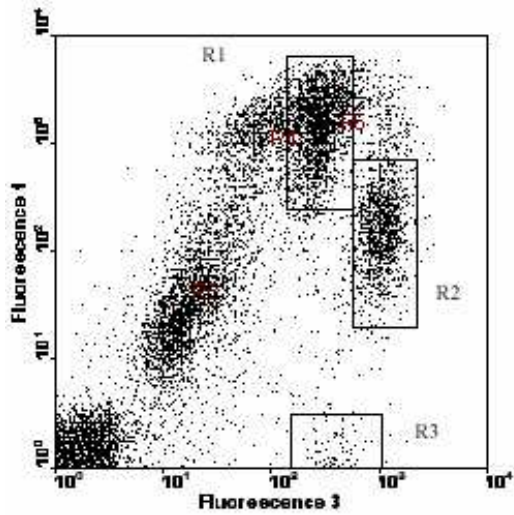


Abb. 3.17: Seminale Leukozyten, mit CD45 (FL3) und CD15 (FL1) markiert.

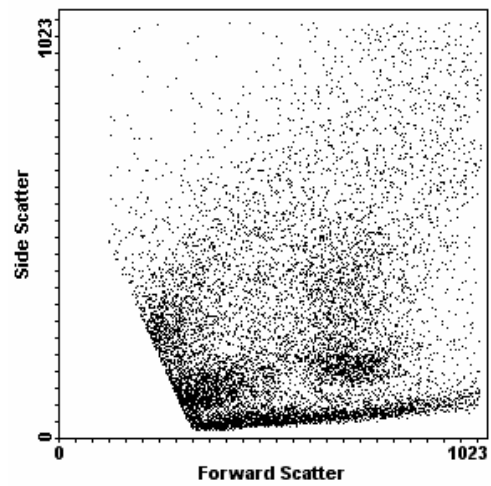


Abb. 3.18: Darstellung der Messung in FSC/ SSC

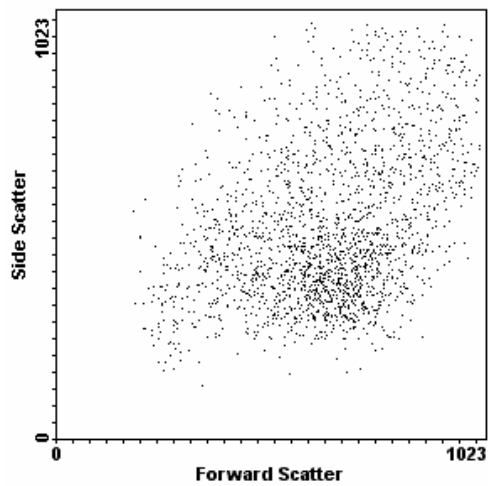


Abb. 3.19: R1- Darstellung der Granulozyten

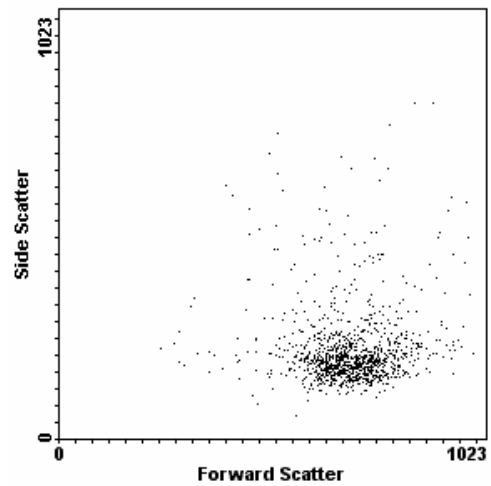


Abb. 3.20: R2- Darstellung der Monozyten

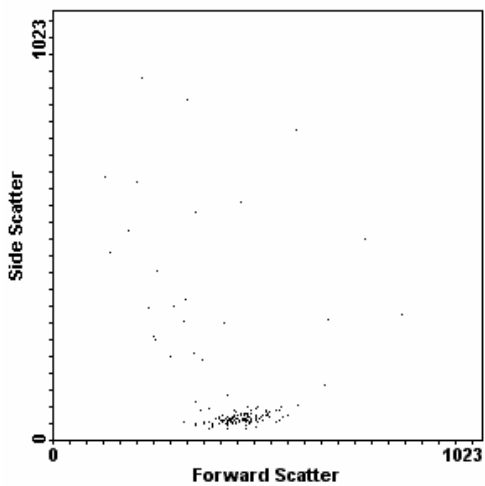


Abb. 3.21: R3- Darstellung der Lymphozyten

3.4.4 CD14

Mit Hilfe des Antikörpers CD14, der menschliche Monozyten identifiziert, läßt sich diese Zellpopulation sowohl im Blut als auch im Ejakulat klar von anderen Bestandteilen abgrenzen.

Nachfolgend ist das Ergebnis einer flowzytometrischen Messung einer Blutprobe abgebildet. Die FSC/SSC- Darstellung der in R1 gegateten Zellen zeigt die deutlich formierte Population der Monozyten, die in dieser Probe 5,1% der erfassten Zellen ausmachen.

Der Anteil der Granulozyten (R2) liegt bei 72,0%, der der Lymphozyten bei 22,9%.

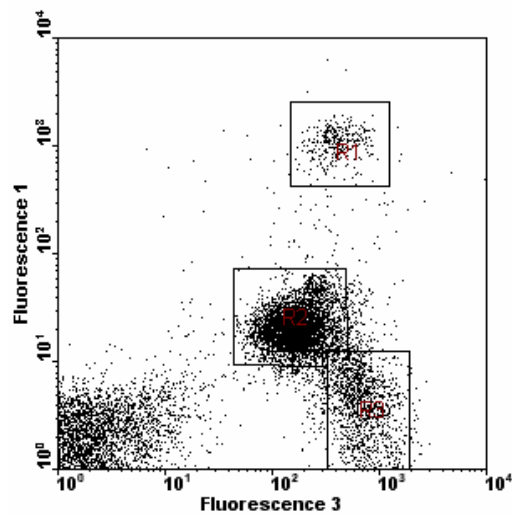


Abb. 3.22: Färbung peripherer Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD14 (FL1).

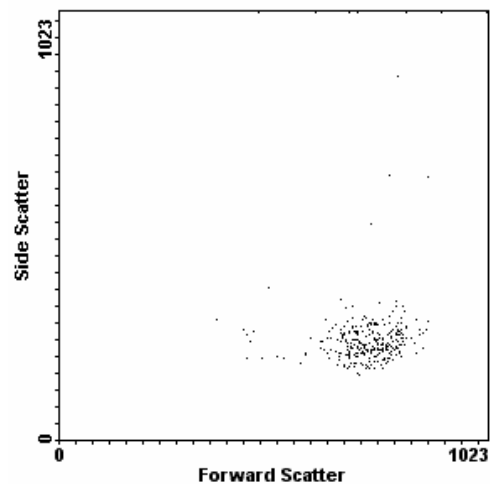


Abb. 3.23: R1- Darstellung der Monozyten

Im Ejakulat sind die Monozyten mit durchschnittlich 20,3% (10,7 bis 38,8%) zweitgrößte Leukozytensubpopulation nach den Granulozyten, die mit einem prozentualen Anteil von 76,0% (55,2 bis 85,1%) die weitaus größte Gruppe der Leukozyten einnehmen. Lymphozyten sind nur in geringer Zahl vorhanden. Durchschnittlich 3,8% (1,1 bis 7,2%) aller erfassten Zellen konnten bei der Antikörperfärbung mit CD14/ CD45 aufgrund ihrer Lokalisation im Dotplot als Lymphozyten identifiziert werden.

CD14 ist ein Antikörper, der sich stärker an Monozyten als an alle anderen zellulären Bestandteile der Proben bindet und sie somit klar von den übrigen Zellgruppen abtrennt.

Im Gegensatz zu den meisten sonst in diesen Versuchsreihen verwendeten Markern ist er deshalb sehr gut auch für die Differenzierung von Leukozyten im Ejakulat geeignet.

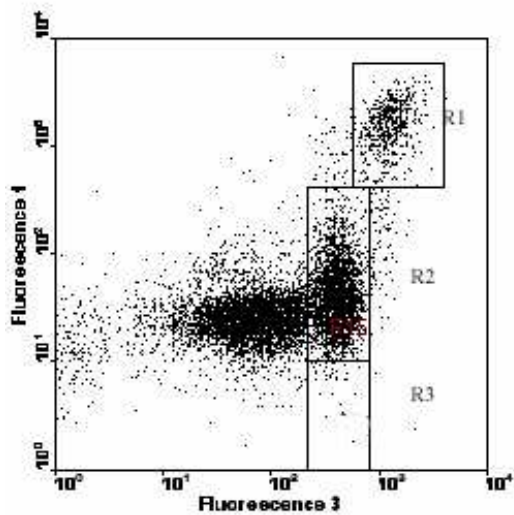


Abb. 3.24: Seminale Leukozyten, gefärbt mit CD45 (FL3) und CD14 (FL1).

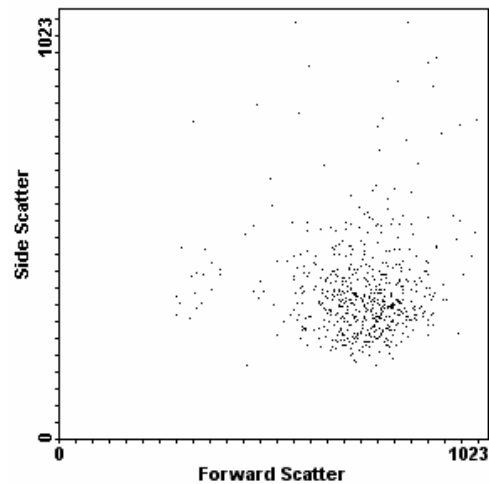


Abb. 3.25: R1- Darstellung der Monozyten

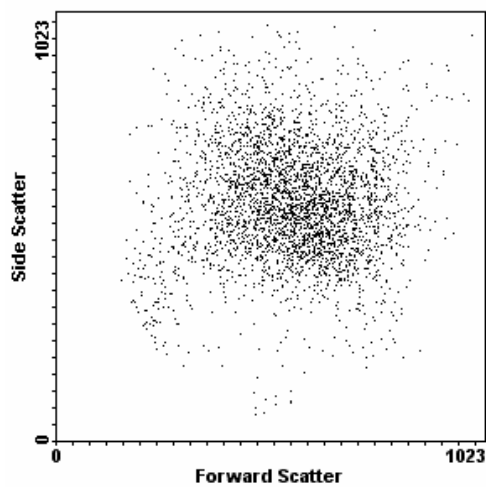


Abb. 3.26: R2- Darstellung der Granulozyten

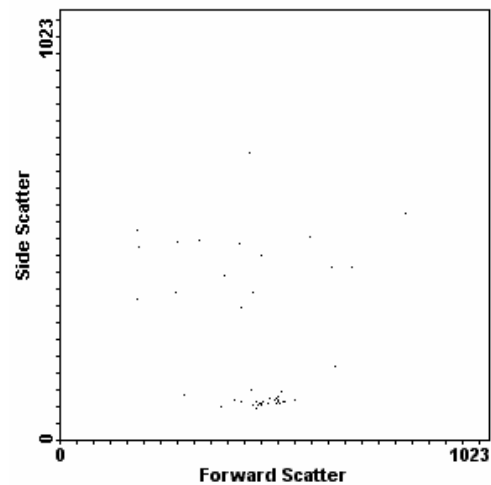


Abb. 3.27: R3- Darstellung der Lymphozyten

3.4.5 CD 19

Wie die Abbildungen zeigen lassen sich B- Zellen im Blut mit Hilfe von CD19 markieren. Gated man die Lymphozyten und stellt sie in FSC/ SSC dar, kann man B- und T- Zellen gut voneinander unterscheiden.

Die Messung ergab einen prozentualen Anteil von 2,1% B- Lymphozyten, 17,9% T- Lymphozyten und 60,7% Mono- und Granulozyten.

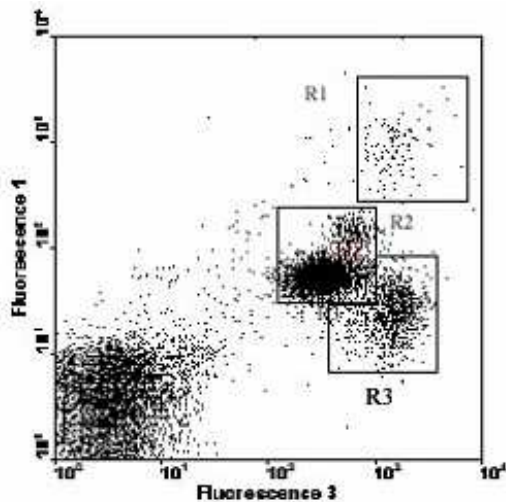


Abb. 3.28: Periphere Lymphozyten, mit CD45 (FL3) und CD19 (FL1) markiert. R1 B- Zellen, R2 Granulo- und Monozyten, R3 T Zellen

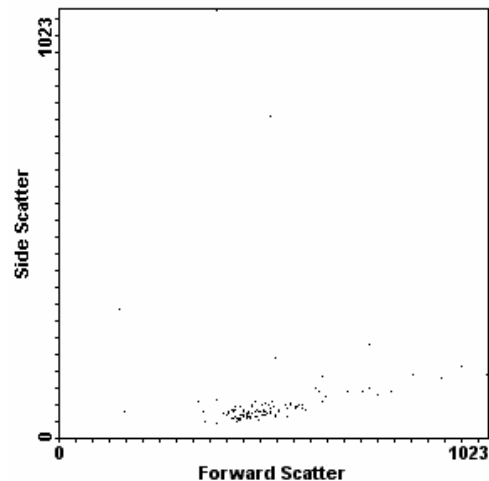


Abb. 3.29: R1- Darstellung der B-Lymphozyten

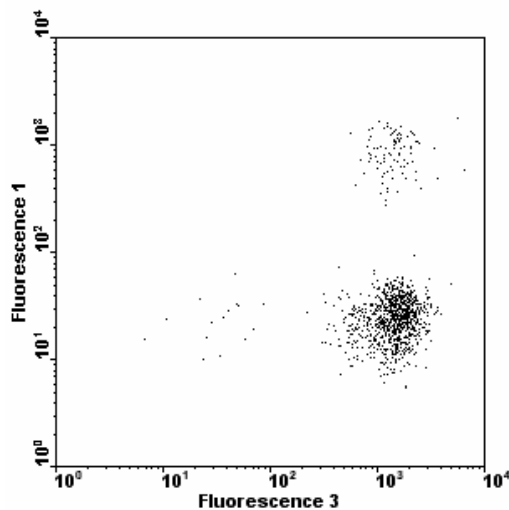


Abb. 3.30: FL1/ FL3- Darstellung der in FSC/SSC gegateten Lymphozyten. Deutliche Trennung der B- Zellen (FL1 positiv) und T- Zellen (FL1 negativ)

In dieser Versuchsreihe gelang es nicht, B- Lymphozyten im Ejakulat als eigene Population von T- Zellen zu differenzieren. Grund dafür könnte der verschwindend geringe Anteil dieser Zellen im Ejakulat sein.

Alle anderen Leukozyten sind gut zu unterscheiden.

Die 10 ausgewerteten Messungen ergaben einen Granulozyten- Anteil zwischen 53,7% und 81,1%, mit einem Mittelwert von 71,2%. Bei Monozyten findet man Werte zwischen 16,7% und 39,7%; der Mittelwert beträgt 25,7%. Die dargestellten Lymphozyten sind nicht CD19 markiert, entsprechen also wahrscheinlich den T- Zellen. Sie machen 1,0% bis 6,6% an der Gesamtzellzahl aus mit einem mittleren prozentualen Anteil von 3,1%.

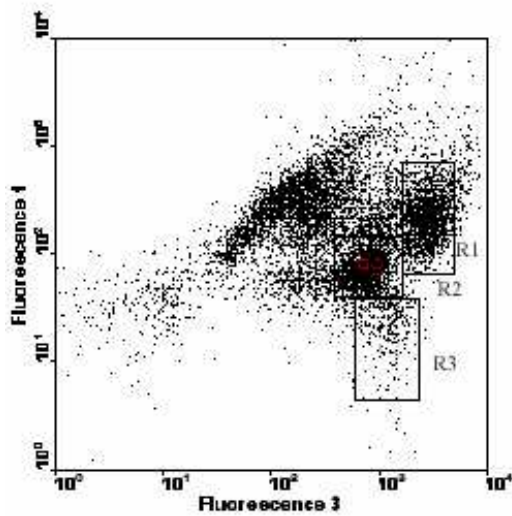


Abb. 3.31: Färbung seminaler Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD19 (FL1).

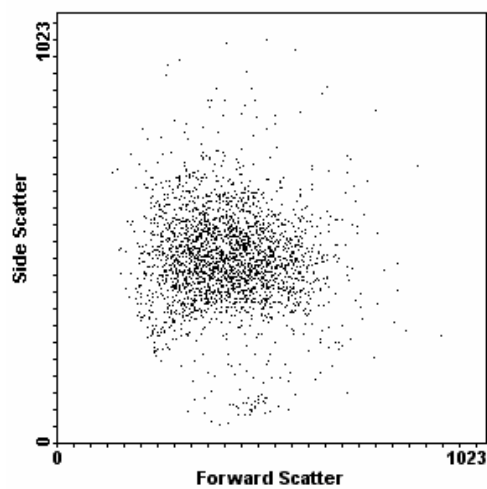


Abb. 3.32: R2- Darstellung der Granulozyten

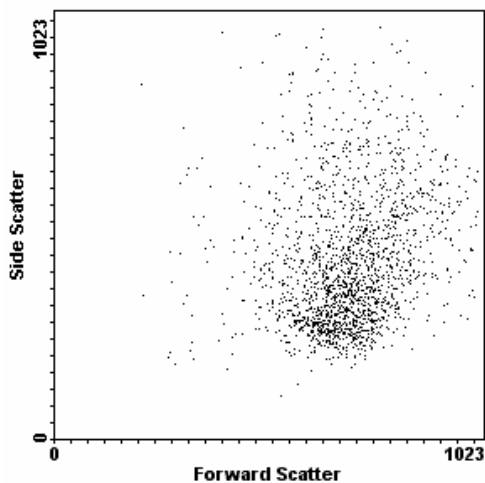


Abb. 3.33: R1- Darstellung der Monozyten

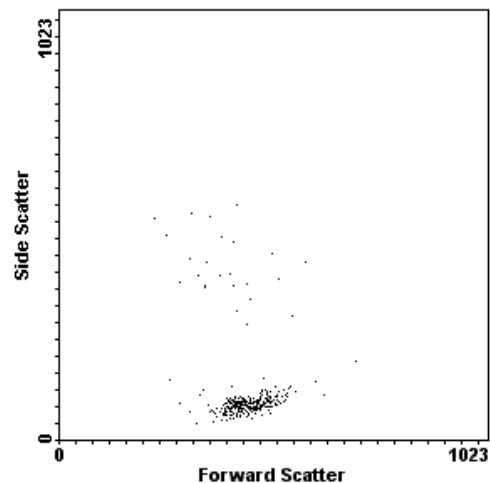


Abb. 3.34: R3- Darstellung der FL1 negativen Lymphozyten (T- Zellen)

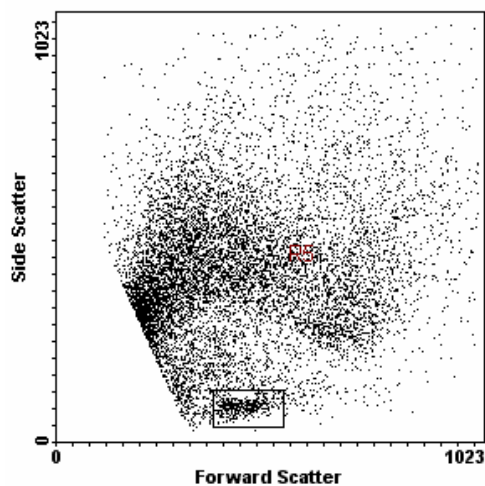


Abb. 3.35: FSC/ SSC- Darstellung der Messung

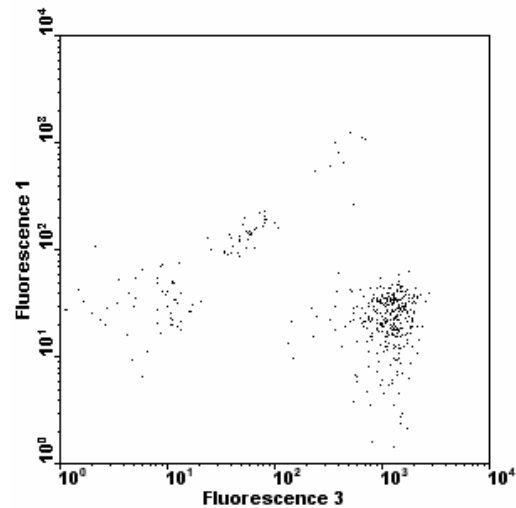


Abb. 3.36: FL1/ FL3- Darstellung der in FSC/SSC gegateten Lymphozyten. Die CD45-positiven Zellen sind fast sämtlich CD19 negativ.

3.4.6 CD22

Gemeinsam mit CD19 wurde CD22 als B- Zellmarker verwendet. Wie die folgende Abbildung zeigt, lassen sich die B-Lymphozyten (R1) des Blutes damit gut abgrenzen.

In dieser Probe machen sie 2,4% aller Leukozyten aus. Im Übrigen finden sich außerdem 23,1% CD22- negative Lymphozyten und 74,5% Granulozyten und Monozyten, die sich hierbei nicht weiter differenzieren lassen.

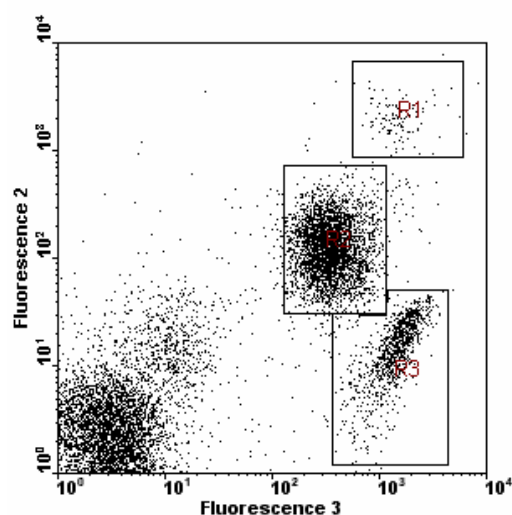


Abb. 3.37: Färbung der peripheren Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD22 (FL1). R1: B- Lymphozyten, R2: Granulo- und Monozyten, R3: T- Lymphozyten

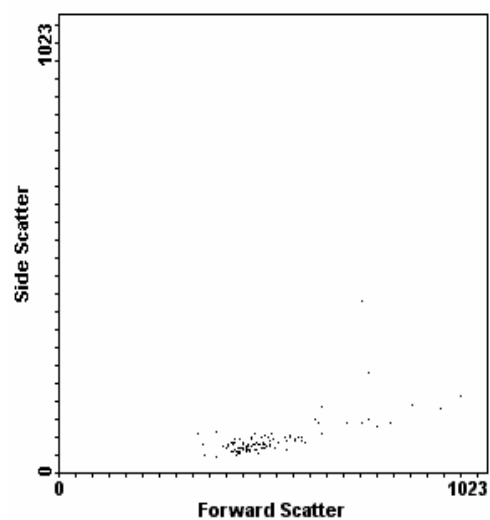


Abb. 3.38: R1- Darstellung der B- Zellen.

Gated man die Lymphozyten in FSC/SSC und stellt die in diesem Gate vorhandenen Zellen in FL3/ FL2 dar, findet man zwei durch die Anfärbbarkeit mit CD22 getrennte Zellgruppen, die den B- bzw. T- Lymphozyten entsprechen.

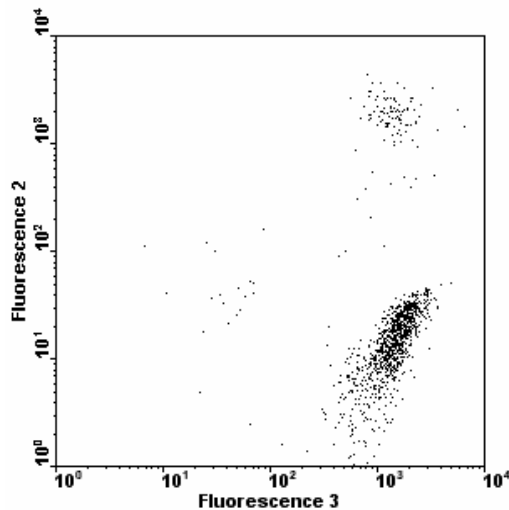


Abb. 3.39: FL2/ FL3- Darstellung der in FSC/SSC gegateten Lymphozyten. Gute Trennung in B-Zellen (CD22- positiv) und T- Zellen (CD22- negativ).

Im Ejakulat lassen sich die Lymphozyten nicht in die beiden Subpopulationen aufspalten.

Zwar findet man eine Gruppe CD22- negativer Lymphozyten, jedoch entspricht die am stärksten CD22- positive Punktwolke den Monozyten. Im Gegensatz zu den Leukozyten im Blut trennen sich in den 9 ausgewerteten Messungen die Monozyten (R1) im Ejakulat deutlich von den Granulozyten (R2) ab. Durchschnittlich fanden sich 24,3 % Monozyten (13,6 bis 36,2%) unter den erfassten Leukozyten, sowie 71,5% Granulozyten (57,4 bis 83,8%). Der mittlere prozentuale Anteil der CD22 negativen Lymphozyten liegt bei 4,1 % mit Werten zwischen 1,4 und 8,6%. In 4 Messungen bereitete die Abgrenzung der Lymphozyten von den Granulozyten Probleme; diese Ergebnisse sind nicht in die Berechnung der entsprechenden Mittelwerte einbezogen.

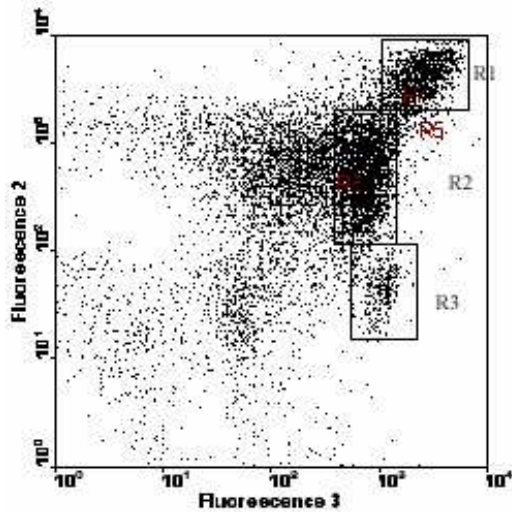


Abb. 3.40: Seminale Leukozyten, markiert mit CD45 (FL3) und CD22 (FL2).

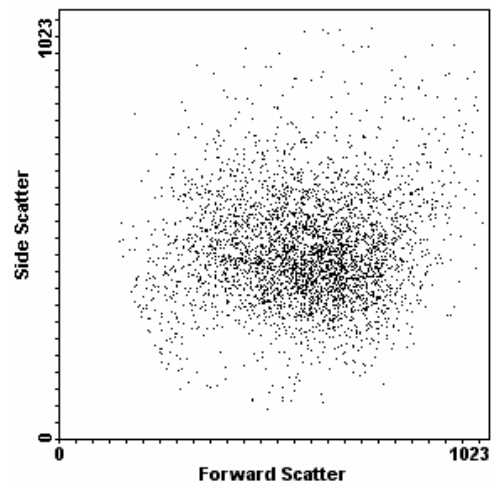


Abb. 3.41: R2- Darstellung der Granulozyten

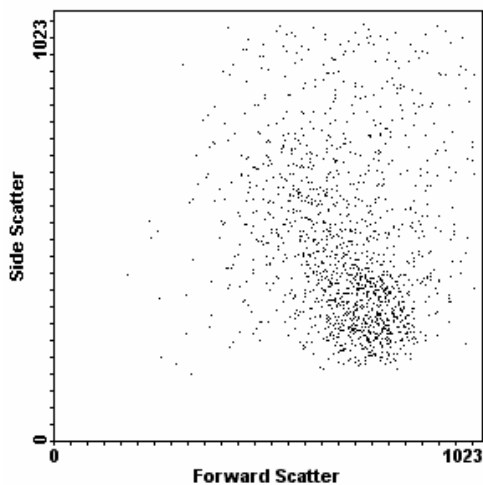


Abb. 3.42: R2- Darstellung der Monozyten

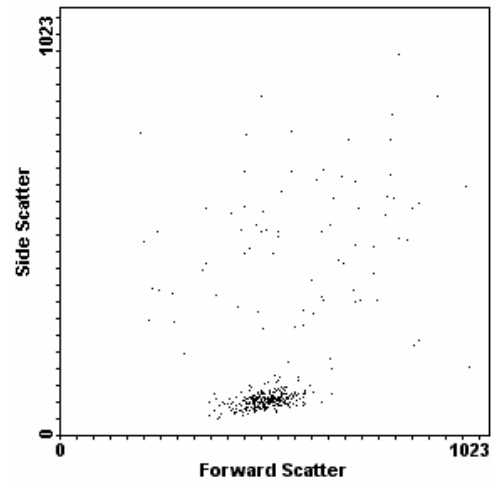


Abb. 3.43: R3- Darstellung der CD22-negativen Lymphozyten.

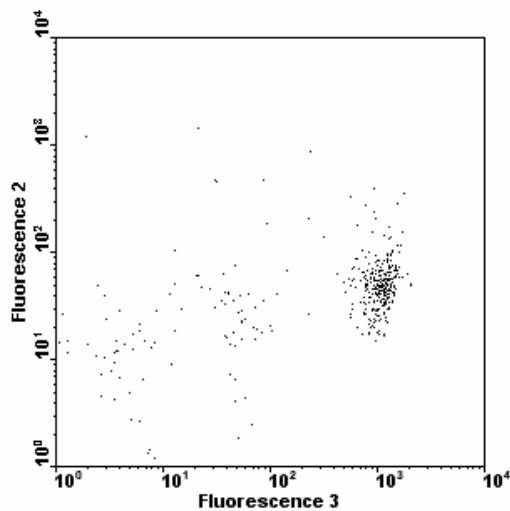


Abb. 3.44: FL2/ FL3- Darstellung der in FSC/SSC gegateten Lymphozyten. Lediglich CD22- negative T- Zellen werden abgebildet.

3.4.7 CD3

In den Messungen, die mit CD3 durchgeführt wurden, stellt man fest, dass sich die T- Lymphozyten nicht so deutlich von den anderen Zellen unterscheiden, wie man in den Vorversuchen mit zu Ejakulat zugemischten Blutleukozyten beobachten konnte. Allerdings findet man, wenn man die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC gated, eine deutlich abgrenzbare Gruppe weniger Zellen in FL1/FL3, die sich CD3- und CD45- positiv darstellen. Diese könnten den T- Zellen entsprechen. Bei der geringen Anzahl an Lymphozyten im Ejakulat gestaltet sich jedoch die Differenzierung in B- und T- Zellen schwierig.

Eine weitere Unterteilung der T- Lymphozyten in CD 4- bzw. CD8- positive Zellen war nicht möglich.

In den folgenden beiden Diagrammen ist eine Lymphozytenfärbung mit CD3 und CD45 an Blutleukozyten dargestellt. Man erkennt in Abb. 3.45 im rechten oberen Quadranten die Gruppe der CD3- markierten Zellen. Dass es sich hierbei auch tatsächlich um Lymphozyten handelt, wird in Abb. 3.46 deutlich, die die in R1 gatedete Leukozytengruppe in FSC/ SSC- Darstellung zeigt.

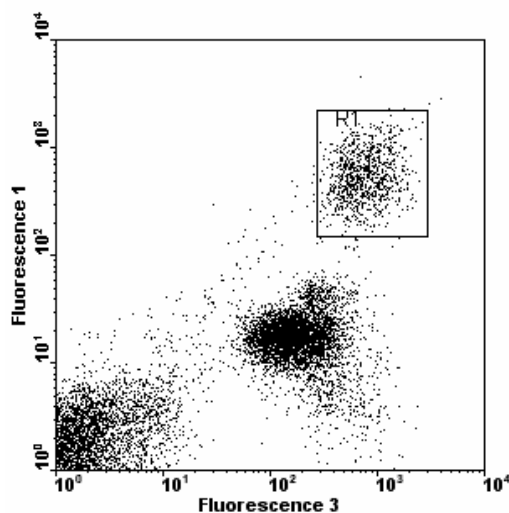


Abb. 3.45: Darstellung der CD45 (FL3)- und CD3 (FL1)- gefärbten peripheren Leukozyten

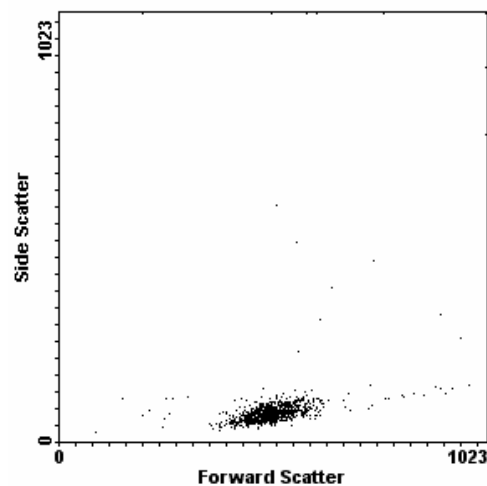


Abb. 3.46: R1- Darstellung der Lymphozyten

Ein Beispiel der Lymphozytenmessungen aus dem Ejakulat zeigt, dass sich in FL1/ FL3 zwar einzelne Populationen abgrenzen lassen wie Granulozyten (R2) und Monozyten (R1), nicht aber die CD3- positive Lymphozyten- Fraktion.

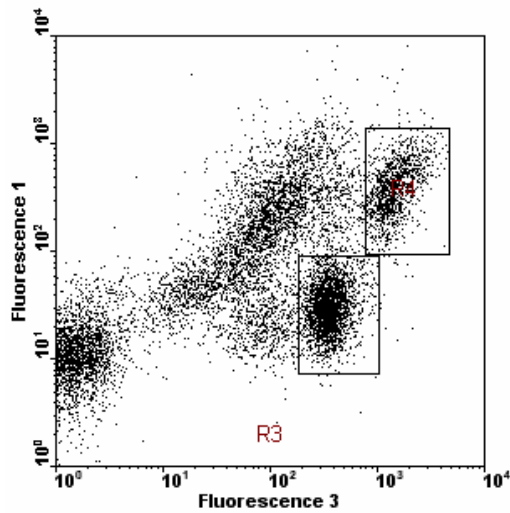


Abb. 3.47: Färbung der seminalen Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD3 (FL1).

Gated man jedoch den Bereich in FSC/ SSC, der bekanntermaßen die Lymphozyten beinhaltet, und projiziert dieses Gate in FL1/ FL3, stellt man fest, dass in dieser Region neben weiteren Bestandteilen des Ejakulats auch die gesuchten Zellen nachzuweisen sind, die sich in FL1/ FL3 durch ihre Färbung gut abtrennen.

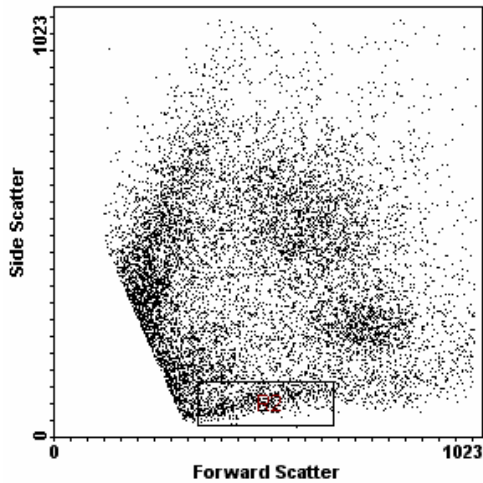


Abb. 3.48: Darstellung der seminalen Leukozyten in FSC/ SSC

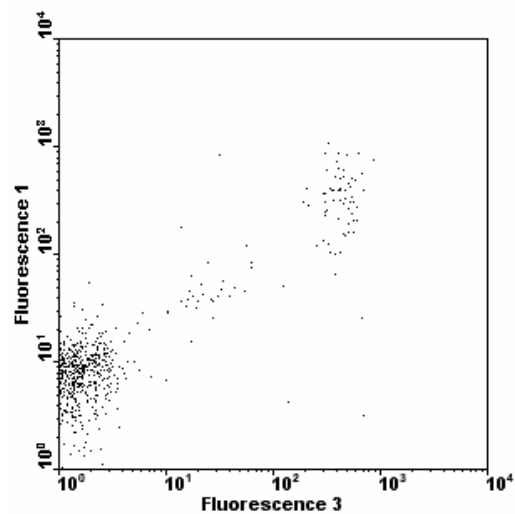


Abb. 3.49: FL1/ FL3- Darstellung der in FSC/SSC gateden Lymphozyten. Eine Gruppe CD3- positiver T- Zellen ist deutlich abzugrenzen.

3.4.8 CD16/ CD56

In unseren Messreihen konnten Natürliche Killerzellen weder im Blut noch im Ejakulat mit der Kombination der Antikörper CD16 und CD56 von anderen Zellen differenziert werden.

Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten konnten nicht als eigenständige Populationen abgegrenzt werden.

3.5 Mikroskopische Kontrolle

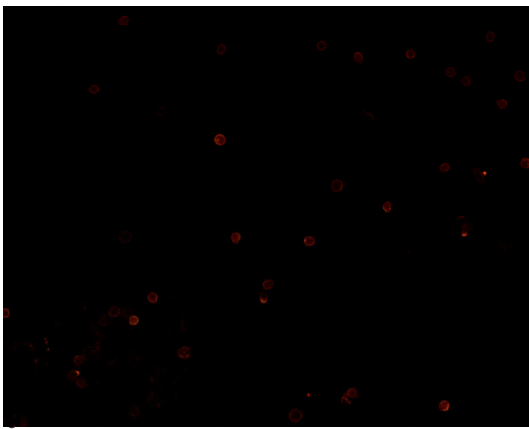


Abb. 3.50: TC- markierte Zellen

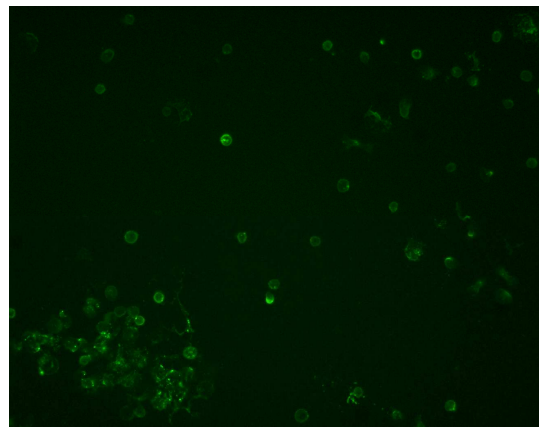


Abb. 3.51: FITC- markierte Zellen

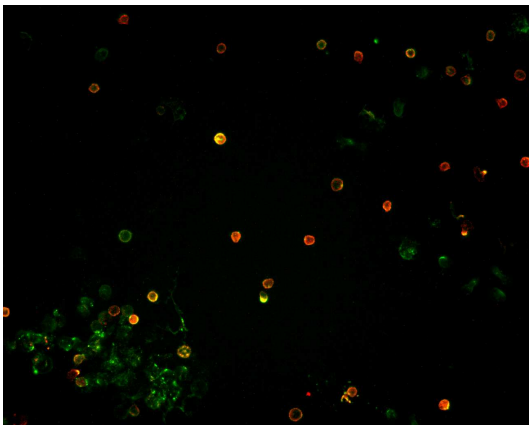


Abb. 3.52: Kombinierte Darstellung von Abb. 3.50
und Abb. 3.51

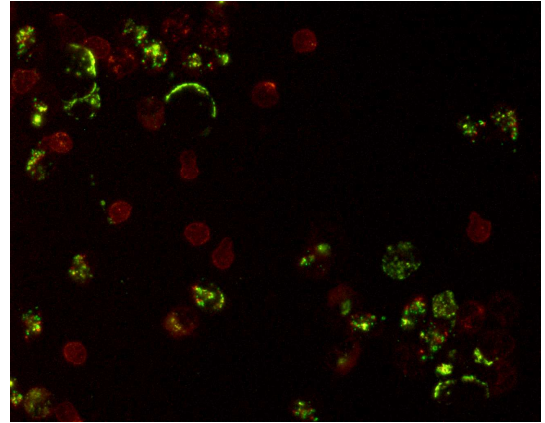
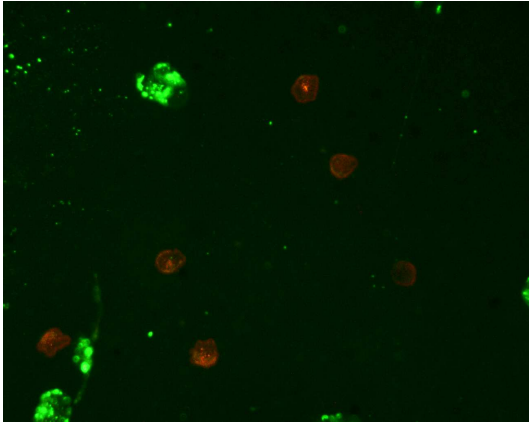


Abb. 3.53 und Abb. 3.54: Kombinierte Darstellung zweier Fluoreszenzen in stärkerer Vergrößerung

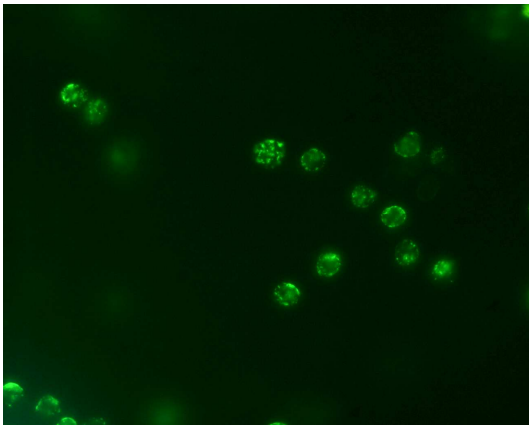


Abb. 3.55: FITC- markierte Zellen in stärkerer Vergrößerung

4 DISKUSSION

4.1 Aufarbeitung der Ejakulate

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden 21 Ejakulate mit mehr als 1×10^6 Leukozyten/ ml mit 10 Antikörpern gegen spezielle Leukozyten-Oberflächenantigene gefärbt und flowzytometrisch ausgewertet.

Verwendet wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper, die in klinischen Labors zur Differenzierung der Leukozyten routinemäßig Anwendung finden. Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper nach der Inkubation zu entfernen, wurden die Proben zwei Waschschritten unterzogen. Im Gegensatz zu Gil T. et al. (1998), die dazu PBS verwendeten, wurde in dieser Arbeit SPM benutzt, da diese Lösung extra für die Aufreinigung von Ejakulaten empfohlen wird. In den Vorversuchen war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen PBS- bzw. SPM- Waschungen auszumachen.

Der Ansatz, mittels Dichtegradientenzentrifugation seminale Leukozyten von Debris, abnormen Spermien und Epithelzellen des Urogenitaltraktes zu separieren, erwies sich in den Vorversuchen als nicht brauchbar. Zwar konnte in einem Teil der Messungen Verunreinigungen reduziert werden, was im FSC/SSC Diagramm sichtbar wurde. Dies hatte jedoch keine deutlichen Auswirkungen auf die Abgrenzbarkeit der Leukozyten im FL1/FL3 Diagramm. In früheren Untersuchungen konnten Makler A. et al. (1998) durch Percoll- Zentrifugation motile Spermatozoen von den übrigen zellulären Bestandteilen des Ejakulates abtrennen, da sich Samenzellen dank ihrer Dichte und Eigenbeweglichkeit im unteren Bereich des Röhrchens ansammeln. Sowohl Leukozyten als auch Debris und andere Rundzellen schafften den Übergang von 40 zu 80% Percoll nicht und blieben allesamt innerhalb der 40%igen Percollschicht.

Diemer T. et al. (1994) scheiterten bei dem Versuch, Leukozytensubpopulationen durch Dichtegradientenzentrifugation aufzutrennen. Sie konnten Granulozyten zwar in bestimmten Schichten anreichern, nicht aber von Spermatozoen und Germinalzellen isolieren.

Monozyten und Lymphozyten befanden sich in dem Bereich niedrigerer Dichte, in dem darüber hinaus unreife Germinalzellen und einige Samenzellen nachgewiesen werden konnten.

Die Befunde dieser Arbeitsgruppen bestätigen, dass diese Methode nicht wesentlich zur Differenzierung der seminalen Leukozyten beiträgt.

Weiterhin konnten die Vorversuche zeigen, dass sich nach Lagerung der gefärbten Proben bei 4°C über ein bis zwei Tage keine gleichwertigen Ergebnisse erzielen lassen. Auf die Verwendung von Fixationsmittel, die eventuell die Stabilität verbessert und eine spätere Auswertung erlaubt hätten, wurde dennoch bewusst verzichtet, um einen möglichen Einfluss auf die Antikörperbindung durch Veränderung antigener Strukturen zu vermeiden (Hancock W.W. et al., 1982).

4.2 Leukozytenverteilung im Ejakulat

Die Messungen ergaben insgesamt ein eindeutiges Überwiegen der Granulozyten unter den seminalen Leukozyten (70-75%), gefolgt von Monozyten als zweitgrößter Leukozytensubpopulation (20-25%). Lymphozyten waren nur in geringer Zahl nachweisbar (3-4%). Dass sich keine exakten Prozentzahlen ermitteln lassen, ist damit zu erklären, dass die Leukozyten bei fast allen Antikörperdarstellungen häufig schon durch den verwendeten Pan- Leukozyten-Antikörper in die verschiedenen Subpopulationen aufgetrennt werden. Da jedoch die Messungen der spezifischen Antikörper separat für jeden Marker ausgewertet wurden, ergeben sich verschiedene Mittelwerte der prozentualen Anteile von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Das Resultat stimmt tendenziell mit den Befunden von Wolff H. (1995) sowie Tomlinson M.J. et al. (1993) überein. Beide fanden in ihren Untersuchungen, in denen Leukozyten mittels monoklonaler Antikörper angefärbt und anschliessend mikroskopisch differenziert wurden, Granulozyten als dominante Leukozytenfraktion, während sie die Zahl der Lymphozyten als sehr gering beschreiben.

Tomlinson M.J. et al. (1993) konnten in 90% der Ejakulatproben Leukozyten nachweisen, jedoch überschritt die Zahl der Leukozyten in lediglich 2,7% der Fälle die von der WHO festgelegte Grenze zur Leukozytospemie. Die Gesamtleukozytenzahl betrug in ihren Messungen $132,8 \times 10^3$, wovon $67,0 \times 10^3$ Neutrophile Granulozyten, $23,9 \times 10^3$ Makrophagen/ Monozyten und $3,78 \times 10^3$ Lymphozyten waren. Die Lymphozyten konnten noch einmal in die verschiedenen Subgruppen aufgeteilt werden. Jedoch waren nicht in allen Proben auch alle Leukozytensubpopulationen nachweisbar. Beispielsweise waren Lymphozyten nur in einem Viertel der untersuchten Ejakulate vorhanden. Leukozyten befanden sich in 100% der von Wolff H. und Anderson D.J. (1988) verwendeten Proben, auch Granulozyten und Monozyten waren in allen Proben nachzuweisen. T- Lymphozyten dagegen konnten lediglich in 53- 78% entdeckt werden, B- Lymphozyten in nur 24- 59%. Die Prävalenz der Leukozytospemie bei Infertilitätspatienten kann nach Schätzungen von Wolff H. (1995) mit 10-20% beziffert werden. Die Verteilung der Subpopulationen ist in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Mittelwert / Ejakulat	Fertile Spender	Infertiliätspatienten
Gesamtleukozyten	1.636.365	7.199.090
Granulozyten	1.348.160	5.407.075
Monozyten/Makrophagen	175.897	978.557
CD4 T- Zellen	9205	155.504
CD8 T- Zellen	6250	86.112
B- Zellen	2737	88.634

Tab. 4.1: Verteilung der Leukozytensubpopulationen bei fertilen und infertilen Patienten (nach Wolff H. und Anderson D.J., 1988)

Die immunhistologischen Analysen von Aitken R.J. et al. (1994) konnten Leukozyten in 97% der Ejakulatproben nachweisen. Die Untersuchungen ergaben eine mittlere Gesamtleukozytenzahl von $6,41 \times 10^4$ Zellen / 10^7 Spermatozoen. Dabei stellten die Granulozyten mit $5,61 \times 10^4$ die grösste Subpopulation. Im Gegensatz zu den oben genannten Untersuchungsergebnissen übertraf die Zahl der Lymphozyten in den Messungen von Aitken R.J. et al. (1994) mit $1,24 \times 10^4$ (davon B- Zellen: $0,46 \times 10^4$, T- Zellen $0,78 \times 10^4$) die der Monozyten ($0,26 \times 10^4$). $4,11 \times 10^4$ Zellen wurden als Germinalzellen identifiziert.

Aitken R.J. et al. (1994) postulieren, dass die Anwesenheit der Leukozyten mit der der germinalen Zellen assoziiert ist.

Man findet in der Literatur aber auch einige konträre Meinungen bezüglich der Leukozytenverteilung, die generell die Monozyten als größte Population propagieren (Gil T. et al., 1998) oder sogar von Lymphozyten als allgemein vorherrschender Zellgruppe berichten (Couture M. et al., 1976). Couture M. et al. (1976) verwendeten für ihre Untersuchung die Bryan- Leishman- Färbung. Die Bryan Färbung färbt die Akrosomenkappe der Spermatozoen und soll so zur Differenzierung zwischen Spermatiden und Lymphozyten beitragen, während die Leishmann- Färbung in der Lage ist, die Leukozyten, genauer gesagt die Peroxidase- positiven Granulozyten, sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurden keine Monozyten gemessen, die Gesamtleukozytenzahl setzte sich aus Granulozyten und Lymphozyten zusammen.

Dagegen wiesen Gil T. et al. (1998) die seminalen Leukozyten mittels monoklonaler Antikörper und Flowzytometrie nach. In etwa 40% der Proben wurden auf diese Weise CD45- positive Zellen ermittelt. Sie beschreiben in ihrer Studie eine Dominanz der Monozyten in allen Ejakulaten und unterteilen die in die Untersuchung aufgenommenen Patienten in fertil, steril und ASA negativ, steril und ASA positiv. Eine Korrelation zwischen ASA und Leukozytenzahl konnte nicht festgestellt werden.

Mittelwerte in $10^3/\text{ml}$ Ejakulat	Fertil	Steril+ ASA neg	Steril+ ASA pos
Leukozyten insges.	258,1	546,2	374,3
Monozyten	157,5	302,2	222,1
Granulozyten	57,3	49,7	58,2
Lymphozyten	43,1	134,6	94,4
B-Zellen	10,1	46,8	21,1
T-Zellen	31,7	74,5	41,3
LGL	4,5	10,8	30,7

Tab. 4.2: Verteilung der Leukozytensubpopulationen bei fertilen und sterilen Patienten mit und ohne ASA (antisperm antibody) (Gil T. et al., 1998)

Während sich die hier untersuchten Ejakulate bezüglich der Verteilung der Leukozytensubpopulationen gleichen, konnten Wolff H. und Anderson D.J. (1988) sowie Aitken R.J. et al. (1994) individuelle Unterschiede feststellen, denn gelegentlich dominierten Monozyten oder Lymphozyten in den von ihnen untersuchten Proben. Da diese Arbeiten nicht auf Ejakulate mit erhöhten Leukozytenzahlen beschränkt waren, könnte hierin die Ursache für diese Differenzen zu suchen sein. Aitken R.J. et al. (1994) beobachteten in keinem der Fälle, in denen Lymphozyten vorherrschten, und in nur einem Fall mit Monozytendominanz eine Gesamt- Leukozytenzahl, die die von der WHO gesetzte Schwelle zur Leukozytospemie von 1×10^6 Leukozyten/ml überschritt. Somit wären diese Ejakulate in der hier vorgestellten Versuchsreihe nicht näher untersucht worden, da ja die Leukozytenzählung mittels Peroxidasereaktion normale Werte ergeben hätte.

Im Gegensatz zu vielen Arbeiten, die durch immunhistologische Anfärbung von Ausstrichpräparaten die Zellzahl der Leukozytensubpopulationen bestimmten, war dieses Experiment auf die flowzytometrische Erfassung der Untergruppen ausgerichtet, wodurch in kurzer Zeit eine große Zahl von Zellen gemessen werden kann. Eine genaue Bestimmung der Gesamtzahl der verschiedenen Zellgruppen lässt die Flowzytometrie jedoch nicht zu. Mit dieser Methode ist lediglich eine Erfassung von Verteilungen möglich, so dass ein exakter Vergleich der Ergebnisse dieser Messung mit denen anderer Studiengruppen nicht erfolgen konnte. Da im klinischen Alltag konkrete Zahlen notwendig sind, wenn es um die Beurteilung von Parametern im Vergleich zu den Normwerten geht, ist hierin der entscheidende Nachteil der Flowzytometrie zu sehen.

4.3. Weitere partikuläre Ejakulatbestandteile

Während der flowzytometrischen Messungen wurden Gates in FSC/ SSC gesetzt, um den Bereich der Spermatozoen auszugrenzen. Dennoch waren anschliessend nicht nur Zellen hämatopoetischen Ursprungs im Dotplot sichtbar.

Auffallend waren zwei Regionen, die sich durch hohe Zelldichte auszeichneten:

- (1) ein Bereich, der von der gegateten Region (3) nach rechts oben einstrahlte
- (2) eine annähernd horizontale Linie, die von der gegateten Region ausging und sich über alle FSC Kanäle zog.

Entsprechend der Bedeutung von FSC und SSC beinhaltet der erste Bereich Partikel unterschiedlicher Grösse und Granularität, wobei die beiden Parameter korreliert zu sein scheinen. Im zweiten Fall kommen in der Region Partikel aller Grössen vor, die Granularität ist sehr niedrig und nimmt nicht proportional zur Grösse zu.

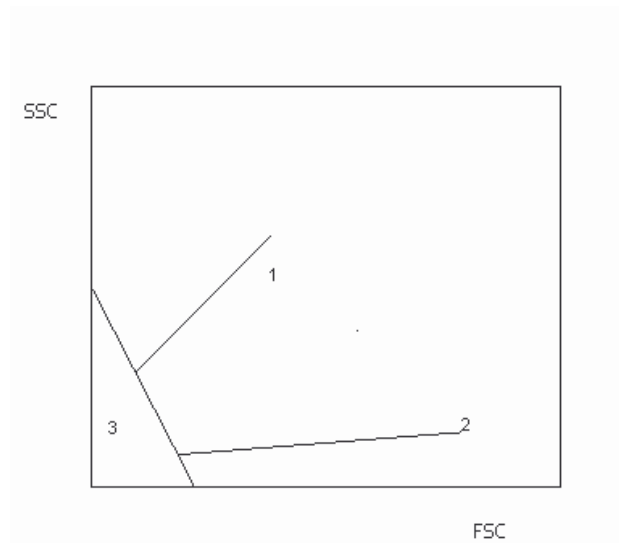


Abb. 4.1: Schematische Zeichnung eines Dotplots mit den auffälligen Regionen 1 und 2 sowie dem ausgegrenzten Bereich der Spermatozoen (3)

Neben Spermatozoen und Leukozyten werden im Ejakulat weitere Rundzellen beobachtet, die im Dotplot zur Darstellung kommen könnten. Dazu gehören abgeschilferte Epithelzellen des Urethraltraktes, Prostatazellen und unreife Keimzellen (runde Spermatiden, Spermatozyten, Spermatogonien) (WHO Handbuch, 1999).

In manchen Ejakulaten findet eine Agglutination motiler Spermatozoen oder die unspezifische Aggregation von Spermien mit Schleimfäden, Zelltrümmern oder andersartigen Zellen statt. Hierdurch werden die Grösse und Granularität des Gesamtpartikels verändert, der sich nunmehr deutlich von normal geformten Spermatozoen unterscheidet. Änderung der für die FSC/SSC- Darstellung relevanten Parameter führt zur Abbildung des Partikels im Diagramm.

Ebenso könnten nicht- zelluläre Bestandteile des Ejakulates oder mit Mukus oder anderen Antikörpern aggregierte monoklonale Antikörper vom Flowzytometer erfasst werden.

Ziyyat A. et al. (1999) untersuchten in einer Studie die Ejakulate von 44 Infertilitätspatienten mit bekannter nicht- obstruktiver Azoospermie. Unter den Proben der hier vorliegenden Arbeit befanden sich ebenfalls 2 Patienten mit Azoospermie.

Die Dotplots von Ziyyat A. et al. sind im folgenden unseren Diagrammen gegenübergestellt.

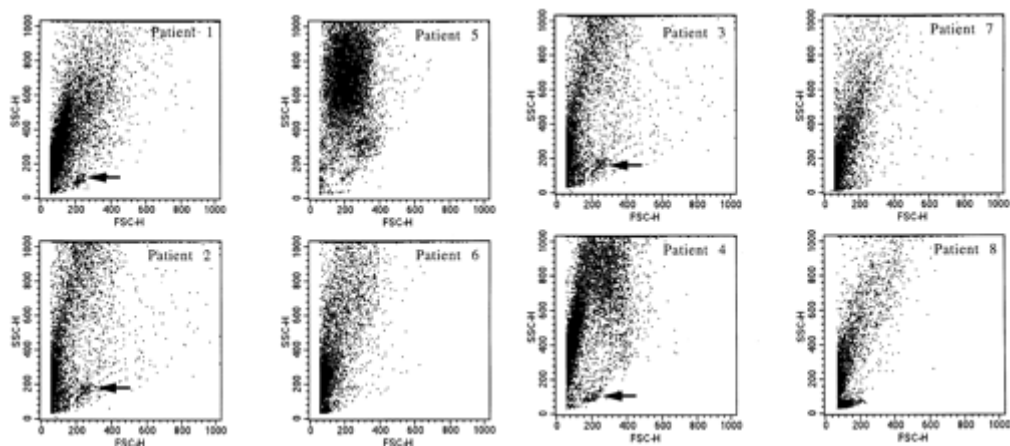


Abb. 4.2: FSC/SSC- Diagramme der von Ziyyat A. et al. (1999) untersuchten Patienten mit Azoospermie.

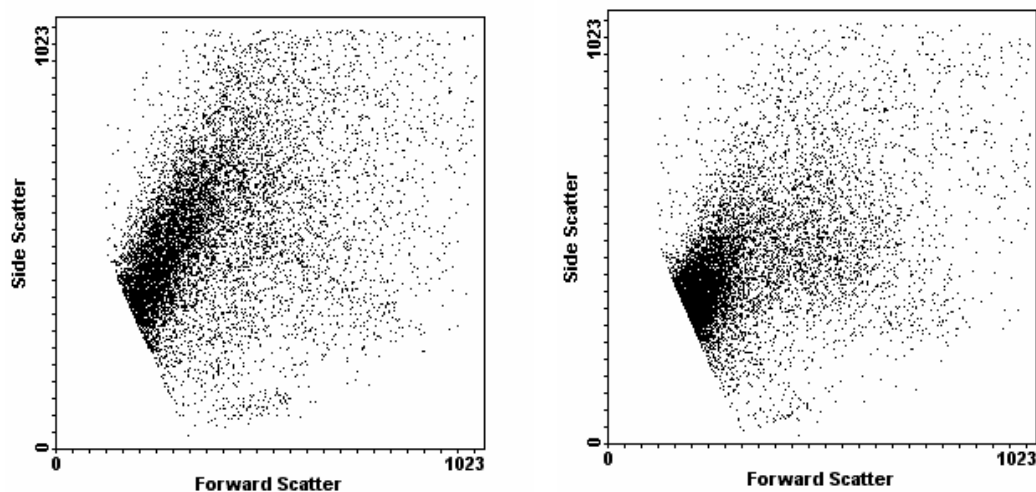


Abb. 4.3: FSC/SSC- Diagramme der in dieser Arbeit verwendeten azoospermischen Ejakulate

In allen abgebildeten Diagrammen findet man die zelldichte Region 1. Nun lässt sich schlussfolgern, dass diese ein Charakteristikum für azoosperme Ejakulate darstellt. In unseren Untersuchungen konnte man diesen Bereich jedoch auch in mehreren Proben beobachten, die Spermatozoen enthielten.

Die Tatsache, dass in dem Ejakulat eines Patienten mit St. n. Vasektomie zwar eine grosse Anzahl von Erythrozyten und Leukozyten, nicht aber der diskutierte Zellbereich nachzuweisen war, lässt die Überlegung zu, dass die gesuchten Ejakulatbestandteile möglicherweise aus Testis oder Epididymidis stammen. Eine schlüssige These kann allerdings nicht aufgrund einer Einzelbeobachtung aufgestellt werden, da das Fehlen der Zellen der Region 1 auch auf individuelle Unterschiede in der Zusammensetzung des Ejakulates zurückzuführen sein könnte. Wichtig wäre daher, diesen Befund an anderen Ejakulatanalysen von vasktomierten Patienten zu bestätigen.

Ziyyat A. et al. (1999) gelang es nicht, runde Spermatiden aus den Ejakulaten zu isolieren. In ihren Diagrammen waren diese Zellen nicht abgebildet. Um zu überprüfen, ob es sich bei den diskutierten Partikeln um Zellen anderer Stufen der Spermatogenese, d.h. um Spermatozyten und Spermatogonien, handelt, könnten Antikörper gegen unreife Germinalzellen eingesetzt werden.

Region 2 dagegen wurde weder in den beiden azoospermen Ejakulaten noch in der des vasktomierten Patienten beobachtet, sondern nur in Samenproben, die Spermatozoen enthielten. Daher lässt sich spekulieren, ob in diesem Bereich möglicherweise agglutinierte oder aggregierte Spermatozoen abgebildet werden. Durch Aneinanderlagern von zwei oder mehreren Spermatozoen oder Spermatozoen mit unterschiedlich grossen Zelltrümmern, Schleimfäden oder Epithelien liesse sich die Kontinuität dieser Region erklären.

Gelegentlich konnten auch beide Regionen gemeinsam in einem Ejakulat nachgewiesen werden, wie die nachfolgende Abbildung zeigt.

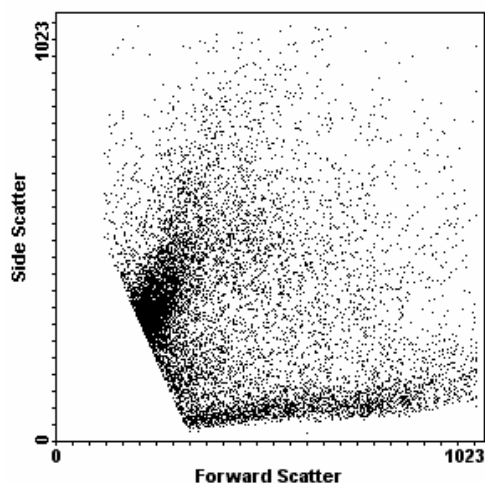


Abb. 4.4: FSC/SSC- Diagramm mit Region 1 und 2

4.4 Färbung durch Aktivierungsmarker

Mit monoklonalen Antikörpern gegen CD69 und CD71 wurde der Versuch unternommen, aktivierte Zellen im Ejakulat nachzuweisen. Obwohl beide antigenen Strukturen bei Zellaktivierung verstärkt an die Membranoberfläche treten und aus diesem Grund zum Aktivitätsnachweis herangezogen werden, sind die Moleküle in ihrer Funktion sehr verschieden.

Kreuzverknüpfung von CD69 durch Antikörperbindung führt bei verschiedenen Zelltypen zu einer intrazellulären Calciumerhöhung (De Maria R. et al., 1994) und soll diverse Reaktionen in den Zielzellen hervorrufen. Dazu zählen Mediatorfreisetzung von Neutrophilen (Walsh G.M. et al., 1996), Cytokinproduktion und Zellproliferation von Lymphozyten (Funke B. et al., 2004), der Produktion von NO in Monozyten (De Maria R. et al., 1994), Induktion der Apoptose bei Eosinophilen (Dallaire M.J. et al., 2003) sowie Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Testi R. et al., 1990). Welche Rolle CD69 genau in der Immunologie spielt, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt (Sancho D. et al., 2005).

Während CD69 auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs begrenzt zu sein scheint, findet sich CD71 auf fast allen Zellarten (Ponka P., Lok C.N., 1999). So konnte diese Struktur auf der Oberfläche von Spermatozyten und Spermatiden (Vannelli B.G. et al., 1986) immunhistochemisch nachgewiesen werden. Weiterhin fanden Keer H.N. et al. (1990) dieses Antigen auf benignen und malignen Prostatageweben.

Funktionell handelt es sich bei CD71 um einen Transferrin- Rezeptor, der zwei eisenbeladene Transferrinmoleküle bindet und sie mittels Endozytose ins Zellinnere aufnimmt. Der saure pH- Wert der Endosomen bewirkt die Dissoziation des Eisens vom Trägermolekül. Mittels Metalltransportern gelangen die Eisenionen ins Zytoplasma (Ned R.M. et al., 2003), wo sie entweder als Ferritin gespeichert oder für die Synthese von Häm oder eisenhaltigen Proteinen genutzt werden (Kuhn L.C., 1989). Transferrin und Rezeptor gelangen zur Plasmamembran zurück (Ned R.M. et al., 2003), der Zyklus kann erneut starten.

Vermehrter Eisenbedarf bei metabolisch aktiven, sich entwickelnden oder proliferierenden Zellen resultiert in einer verstärkten Expression von CD71 auf der Oberfläche (Ponka P., Lok C.N., 1999).

Somit wäre zu erwarten, dass in der durchgeführten Messreihe CD69- und/ oder CD71- positive Zellen ermittelt werden konnten. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Leukozyten in allen vier Proben weder in ihre Subpopulationen unterschieden werden konnten, noch von anderen Partikeln des Ejakulates eindeutig abgrenzbar waren.

Abwesenheit von aktivierten Zellen im Ejakulat wäre eine mögliche, aber eher unwahrscheinliche Erklärung. Dagegen sprechen mehrere Überlegungen:

Es ist anzunehmen, dass bereits durch die Aufarbeitung der Proben einige Zellen in den aktivierten Zustand übergehen. Ausserdem ist CD69 laut Marzio R. et al. (1999) ständig auf der Oberfläche von Monozyten präsent. Desweiteren haben sich verschiedene Autoren mit dem Vorkommen von Zytokinen oder ROS im Ejakulat beschäftigt und die Phagozytose von Spermatozoen durch Leukozyten beobachtet. Sowohl für die Produktion von Mediatoren als auch den Prozess der Phagozytose sind aktivierte Zellen nötig.

Zalata A. et al. (1996) konnten in ihren Untersuchungen sowohl Transferrin als auch eine lösliche Form des Transferrin- Rezeptors im Seminalplasma nachweisen. Es besteht die Möglichkeit, dass Antikörper gegen CD71 spezifisch an diese löslichen Antigene binden. Damit würden die Antikörper dann nicht mehr für die Markierung der membrangebundenen Rezeptoren zur Verfügung stehen.

Andererseits könnten durch die im Seminalplasma vorhandenen Transferrinmoleküle die Bindungsstellen der membrangebundenen Rezeptoren bereits besetzt sein, so dass die zugefügten monoklonalen Antikörper nicht an aktivierte Zellen binden können bzw. mit dem physiologischen Liganden konkurrieren müssen.

Natürliche Moleküle, die in vivo an CD69 binden und dadurch bestimmte Effektorfunktionen hervorrufen, sind noch nicht bekannt (Sancho D. et al., 2005). Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass auch hier eine Konkurrenz zwischen monoklonalen Antikörpern und Bestandteilen des Ejakulates um die Bindungsstelle besteht.

Hale G. et al. (1993) beobachteten, dass die Bindung von Antikörpern an Lymphozytenantigen durch Seminalplasma blockiert wird. Dies könnte auf eine unspezifische Reaktion mit dem Oberflächenmolekül hindeuten. Auch eine strukturelle Veränderung der Antigene durch Bestandteile des Ejakulates, die zum Verlust der Bindungsstelle führen könnte, wäre vorstellbar.

Letztlich bleibt die Ursache der fehlenden Differenzierbarkeit zwischen ruhenden und aktivierten Zellen spekulativ und bietet Raum für weitere Untersuchungen.

4.5. Versuchsreihe

4.5.1 Pan- Leukozytenfärbungen

Voraussetzung für die Differenzierung der Leukozyten in die Subpopulationen ist eine deutliche Anfärbung der Gesamtleukozyten mittels der Pan-Leukozytenantikörper CD45 und CD53. Aus diesem Grund wurden beide Antikörper bereits in den Vorversuchen eingesetzt, wo sie eine Unterscheidung zwischen peripheren Leukozyten und der Gruppe der Ejakulatbestandteile ermöglichten. Auch in der Versuchsreihe liessen sich die Leukozyten im Blut wie im Ejakulat gut abgrenzen. Es zeigte sich jedoch, dass neben seminalen Leukozyten auch andere Zellen eine deutliche, wenn auch schwächere Fluoreszenz aufwiesen, die hauptsächlich aus einer Bindung an CD53 zu resultieren schien.

In der Literatur finden sich Studien, die eine Kreuzreaktivität von Pan-Leukozytenantikörpern mit Zellen des männlichen Genitaltraktes postulieren. Sie beschäftigen sich ausschliesslich mit CD45, während über Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen CD53 keine Literatur vorzuliegen scheint.

Ferrara F. et al. (1997) verwendeten in ihrer Untersuchung Anti- CD53, da 'CD45, der traditionell für die Erkennung von Leukozyten genutzt wird, eine Kreuzreaktivität mit Spermatozoen und unreifen Germinalzellen sowie Urothelzellen zeigte'. Sie zitieren Untersuchungen von Barratt C.L. et al.(1991) und Diemer T. et al. (1994). Letztere scheiterten bei dem Versuch, Leukozyten mit Hilfe von Percoll- Dichtezentrifugation und anschliessender Flowzytometrie

zu identifizieren, und schlussfolgern daraus, dass dies auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit Zellen der Spermatogenese hindeutet. Auch sie berufen sich auf Barratt C.L. et al. (1991). Diese genannte Studie verwendete u.a. einen gegen CD45 gerichteten monoklonalen Antikörper zur immunhistologischen Differenzierung seminaler Leukozyten. Barratt C.L. et al. (1991) zufolge wurden jedoch nur solche Marker benutzt, die sich in vorherigen Untersuchungen (darunter von Wolff H. und Anderson D.J., 1988) ,als zuverlässig und akkurat bei der Erkennung von seminalen Leukozyten' gezeigt hatten. Sie machen keinerlei Aussage zur Kreuzreaktivität des Pan- Leukozytenantikörpers, unterstützen jedoch die Befunde von Wolff H. und Anderson D.J. (1988), wonach gegen CD15 gerichtete Marker an kleine, subzelluläre Ejakulatpartikel binden und so die Identifikation der Granulozyten erschweren.

Es bleiben die Ergebnisse von Wolff H. und Anderson D.J. (1988). Beide gegen CD45 gerichteten Antikörper, die in ihren Untersuchungen getestet wurden, reagierten spezifisch mit Leukozyten und zeigten keinerlei Bindung an die von den Autoren überprüften Zellen des männlichen Genitaltraktes. Somit ist der von Ferrara F. et al. (1997) sowie Diemer T. et al. (1994) geäußerte Verdacht unbegründet, solange keine Studien existieren, die die Kreuzreaktivität von Anti-CD45 mit Gewebe des männlichen Genitaltraktes beweisen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fällt auf, dass die Leukozyten sich von fast allen Antikörperkombinationen in die Subpopulationen aufteilen lassen. So ist die Darstellung der seminalen B- Lymphozyten mit CD19 und CD22 beispielsweise nicht gelungen; Monozyten, Granulozyten und CD19/ CD22 negative Lymphozyten sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Position in der FL3- Achse gut zu differenzieren. Neben den für einzelne Subpopulationen spezifischen Antikörpern wurden alle Proben mit einem Pan-Leukozytenantikörper gegengefärbt. In den meisten Fällen, wie auch bei den B-Lymphozytenfärbungen, wurde dazu CD45 benutzt. Dabei zeigten seminale Monozyten stets eine höhere Fluoreszenz in FL3 als Lymphozyten, die wiederum stärker als Granulozyten von Anti- CD45 markiert wurden. Diese Beobachtung lässt auf eine niedrigere Affinität dieses Antikörpers zu seminalen Granulozyten und Lymphozyten schliessen, während er stark an Monozyten des Ejakulates bindet. Diemer T. et al. (1994) bestätigen diese Vermutung.

Ricci G. et al. (2000) beschreiben ebenfalls eine niedrigere Affinität von Anti-CD45 zu Granulozyten, jedoch ist die Bindung an Lymphozyten ihrer Meinung nach höher als die an Monozyten. Diese Situation trifft nach hier vorgestellten Ergebnissen zwar für die Bindungseigenschaften von CD45 an Leukozyten des Blutes zu, im Ejakulat sind allerdings Monozyten die Zellen, die stets die grösste Fluoreszenz auf der FL3- Achse besitzen. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die Beobachtungen dieser Differenz zwischen peripheren und seminalen Leukozyten bezüglich ihrer Affinität zu CD45 zu verifizieren und mögliche Ursachen zu erforschen.

4.5.2 Granulozytenfärbungen

Granulozyten stellen die größte Gruppe der Leukozyten sowohl im Blut als auch im Ejakulat. Daher ist es für die Bestimmung der Gesamt- Leukozytenzahl von besonderer Bedeutung, die Zahl der Granulozyten exakt zu erfassen. Die Peroxidasemethode bietet dazu eine Möglichkeit durch Reaktion mit Enzymen der Granula. Durch Weiterentwicklungen von Forschung und Technik ist es inzwischen gelungen, Antigenstrukturen auf Zelloberflächen zu identifizieren, fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper zu schaffen und Instrumente wie das Flowzytometer zu konstruieren, die in kürzester Zeit für jeden Partikel Größe, Granularität und mehrere Fluoreszenzen bestimmen. In klinischen Labors werden heute Leukozytensubpopulationen im Blut oftmals auf diese Weise gemessen. Die Frage ist nun, ob diese relativ neue Methode auch für die Auszählung der seminalen Granulozyten geeignet ist und möglicherweise die Peroxidasereaktion ersetzen kann.

Die Ergebnisse der Granulozytenmarker CD13 und CD15 in dieser Versuchsreihe demonstrieren die Probleme der flowzytometrischen Granulozytenbestimmung. Es ist bekannt, dass beide Antikörper nicht für Granulozyten spezifisch sind, sondern auch Monozyten mehr (CD13) oder minder (CD15) stark anfärben. Dies konnten wir mit unseren Befunden bestätigen. Hier zeigte sich jedoch zudem, dass scheinbar nicht nur Zellen der hämatopoetischen Reihe diese Marker binden; auch andere Bestandteile des Ejakulates, insbesondere vermutlich Rundzellen nicht-leukozytischer Genese weisen eine hohe Fluoreszenz auf.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Arbeitsgruppe um Wolff H. (1988), die bei dem Versuch der Charakterisierung von Leukozytensubpopulationen im Ejakulat mittels immunhistologisch gefärbten Ausstrichpräparaten eine Kreuzreaktivität der von ihnen verwendeten, gegen CD15 gerichteten Granulozyten- Antikörper (Dako-M1 und Leu-M1) mit Epithelzellen der Ductuli efferentes des Nebenhodens feststellten. Auch CD13 konnte membrangebunden an Epithelzellen von Ductuli efferentes und Prostata nachgewiesen werden. Zudem findet man dieses Protein als Monomer frei im Seminalplasma (Huang K. et al., 1997).

Weitere Befunde sprechen dafür, dass monoklonale Antikörper mit Zellen des männlichen Genitaltraktes reagieren. Wolff H. und Anderson D.J. (1988) konnten zwar keine Anfärbung von Germinalzellen mit CD15 im Hodengewebe beobachten, sie schliessen aber, dass unreife Germinalzellen des Ejakulates antigene Substanzen auf ihrem Weg aufgenommen haben könnten und daher bei der Ejakulatanalyse mit Granulozytenmarkern kreuzreagieren.

Diese Art der Übertragung eines Membranproteins ist für CD13 beschrieben. Arienti G. et al. (1997) fanden heraus, dass CD13 im Ejakulat an Prostatasomen gebunden ist. Dabei handelt es sich um von der Prostata sezernierte kleine Vesikel, die Cholesterol, Sphingomyelin und Calcium enthalten und den Spermien zu größerer Motilität verhelfen. Bei leicht saurem pH-Wert findet ein Transfer von CD13 von den Prostatasomen auf Spermatozoen statt (Arienti G. et al., 1997).

Darüberhinaus wurde CD15 in der Kopfregion akrosomreagierter Spermatozoen nachgewiesen (D´Cruz O.J. et al., 1997).

Zwar wurden in den durchgeführten Messungen dieser Arbeit Gates im FSC/SSC-Diagramm gesetzt, durch die der Bereich, in dem sich üblicherweise der Großteil der Spermatozoen abbildet, ausgegrenzt wurde. Da für diese Grenze allerdings die Größe und Granularität normal geformter Spermatozoen als Maßstab galt, wäre es denkbar, dass morphologisch veränderte oder aneinandergelagerte Zellen durch dieses Gitter fallen und somit doch zur Darstellung kommen.

Wolff H. und Anderson D.J. (1988) gelang es in ihrer Untersuchung aufgrund der Kreuzreaktivität nicht, die Granulozyten allein anhand der immunhistologischen Färbung von Rundzellen zu differenzieren. Sie benötigten für deren Identifikation zusätzliche Kriterien.

Ein weiteres Problem, dass sich in unseren Messungen manifestierte, war die Bindung an vermutlich subzelluläre Partikel unterschiedlicher Grösse. Auch dieses Phänomen ist bereits von Wolff H. und Anderson D.J. (1988) sowie Barratt C.L. et al. (1991) beschrieben worden.

Somit ist die exakte Bestimmung seminaler Granulozyten durch Markierung mit Granulozyten- Antikörpern weder mikroskopisch noch flowzytometrisch zu erreichen.

Jedoch hat auch die Peroxidasemethode deutliche Nachteile. Da sie die Granulozyten durch die Markierung der Granula hervorhebt, können durch einen Entzündungsprozess aktivierte Zellen durch den Verlust ihrer Granula nicht angefärbt werden. Dadurch wird die Zahl der Granulozyten in einer Vielzahl von Proben zu niedrig gemessen. Villegas J. et al. (2002) beziffern die Anzahl der Patienten mit Leukozytospemie, die durch die Peroxidasereaktion nicht entdeckt wurden, mit 52,6%. Selbst Proben, in denen mit immunzytologischen Methoden mehr als 10^6 Granulozyten nachgewiesen wurden, können durch den Verlust der Peroxidaseaktivität im Rahmen der Zellaktivierung mit der Peroxidasemethode deutlich unter der Leukozytospemiegrenze liegen (Villegas J. et al., 2002).

Um die flowzytometrische Differenzierung der Granulozyten zu erleichtern, könnte man versuchen, die Zahl der Spermatozoen, unreifen Germinalzellen und Epithelzellen zu reduzieren. Da dies aber mit einem erhöhten Arbeitsaufwand einhergeht und vermehrt Kosten verursacht, ist ein solches Vorgehen für die Routinediagnostik eines andrologischen Labors nicht zu empfehlen, sondern höchstens Forschungszwecken zur genaueren Untersuchung der seminalen Granulozyten vorbehalten.

Beispielsweise ergab eine neuere Studie (Huschak G. et al., 2003), dass durch Bindung von monoklonalen Antikörpern an CD13 die mRNA von IL-8 in Monozyten hochreguliert wird. Der genaue Vorgang sowie der Ligand in vivo sind noch nicht bekannt.

IL-8 ist ein Zytokin, welches von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten produziert wird (Wolff H., 1995). Es dient als chemotaktisches Signal zur Anlockung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Eggert-Kruse W. et al., 2001).

In mehreren Untersuchungen konnten erhöhte Konzentrationen von IL-8 im Seminalplasma leukozytospermer Proben festgestellt werden. (Shimoya K. et al., 1993; Eggert- Kruse W. et al., 2001; Friebe K. et al., 2003) Neben der Möglichkeit, dass Leukozyten und IL-8 als Parameter eines entzündlichen Geschehens im Ejakulat vorkommen, wäre zu überprüfen, ob CD13- positive Zellen in der Lage sind, durch Ligandbindung direkt eine Interleukinerhöhung auch im Ejakulat zu induzieren.

4.5.3 Monozytenfärbung

Um die seminalen Monozyten von Granulozyten und Lymphozyten sowie von weiteren Ejakulatbestandteilen abgrenzen zu können, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CD14 verwendet, ein Antigen, welches man bis zu 93% auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen findet (Diemer T. et al., 1994). CD14 agiert als Rezeptor, der bestimmte Muster bakterieller Zellwandbestandteile erkennt, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) der gramnegativen Bakterien (Janeway C.A. et al., 2001) oder Peptidoglykane der grampositiven Mikroorganismen (Gupta D. et al., 1996).

Die Interaktion zwischen LPS und CD14 wird durch ein Plasmaprotein, das als LPS- bindendes Protein (LBP) bezeichnet wird, vereinfacht, indem es den Transfer von monomerem LPS auf CD14 katalysiert (Harris C.L., 2001).

Bindet ein solcher LPS/LBP- Komplex an CD14, lagern sich der sogenannte Toll-like receptor-4 (TLR-4) und ein assoziiertes Protein MD-2 an einen extrazellulären leuzinreichen Abschnitt von CD14 an (siehe Abbildung 4.5).

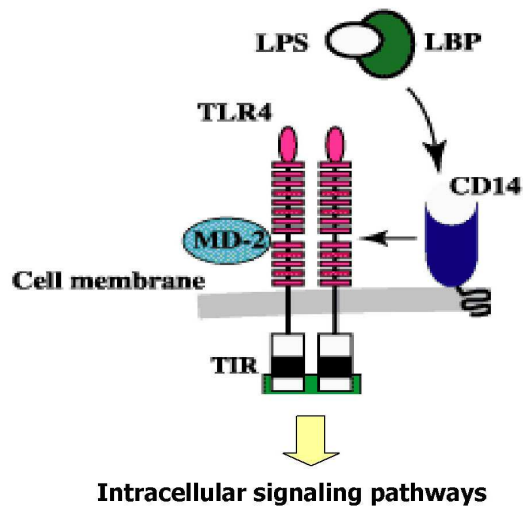


Abb. 4.5: Beschreibung im Text, nach Bendtzen K. et al., 2000.

Die Toll- Interleukin1- Rezeptor- Domäne (TIR) bewirkt über eine Kaskade von Enzymen die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF κ B aus einem inhibitorischen Protein (I κ B) (Janeway C.A. et al., 2002). Das auf diese Weise aktivierte NF κ B ist nun in der Lage, sich im Zellkern an Promotoren anzulagern, ein Vorgang, der die Transkription von bestimmten Genen nach sich zieht. Dazu gehören auch die verschiedener inflammatorisch wirkender Mediatoren (Compton T. et al., 2003).

Darüberhinaus führt die Bindung des LPS/LBP- Komplexes an den Rezeptor mittels Makropinozytose zur Aufnahme von LPS in das Zellinnere, wo es von spezifischen Enzymen (Azyloxyazyl- Hydrolase) der phagozytischen Granula unschädlich gemacht wird (Poussin C. et al., 1998).

Auch Peptidoglykane führen durch Anlagerung an CD14 zu einer Reaktionskette, die in einer Aktivierung von NF κ B resultiert. Im Gegensatz zu LPS sind sie jedoch nicht in der Lage, einen Komplex mit LBP zu bilden, der die Interaktion mit dem Rezeptor verstärkt (Gupta D. et al., 1996).

Neben Monozyten kann CD14 ebenfalls auf der Oberfläche von Neutrophilen und B- Zellen nachgewiesen werden. Desweiteren entdeckten Harris C.L. et al. (2001), dass CD14 auch von Spermatozoen exprimiert wird und homogen über deren Oberfläche verteilt ist. Möglicherweise dient es den Spermatozoen dazu, bakterielle Bestandteile zu erkennen und entsprechend durch die Produktion von ROS oder Interleukinen zu reagieren (Harris C.L. et al., 2001).

Aufgrund der Kreuzreaktivität mit Samenzellen wurde bei der flowzytometrischen Messung der Ejakulatproben in dieser Studie der Bereich des FSC/SSC Diagramms, indem sich Spermatozoen und Debris abbilden, von der Analyse ausgeschlossen. Dies hat zur Folge, dass Spermatozoen dieser Region, selbst wenn sie CD14 positiv sind, nicht zur Darstellung kommen und die Differenzierung der Monozyten nicht negativ beeinflussen können.

Zusätzlich zu membrangebundenem CD14 wurden diese Moleküle auch in ungebundener Form in zahlreichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Dazu gehören Serum, Urin (Pan Z. et al., 2000), Seminalplasma (Harris C.L. et al., 2001), Vaginalsekret (Fichorova R.N. et al., 2002), Muttermilch (Labeta M.O. et al., 2000), Amnionflüssigkeit (Harris C.L., 2001), Liquor (Harris C.L. et al., 2001) und Speichel (Uehara A. et al., 2003).

Auch als gelöstes Molekül besitzt CD14 die Fähigkeit, LPS zu binden und über TLR-4 eine Aktivierung selbst CD14 negativer Zellen wie Endothel- oder Epithelzellen herbeizuführen (Poussin C. et al., 1998).

Durch nachfolgende Sekretion verschiedener Zytokine wie IL-8 werden neutrophile Granulozyten aktiviert und chemotaktisch herangelockt.

Mit Hilfe des verwendeten Markers gelang die Identifizierung von Monozyten in 17 Ejakulatproben. Die sowohl CD14 als auch CD45- positiven Zellen entsprachen im FSC/SSC Diagramm den Monozyten. Selbst eine Differenzierung der Granulozyten und Lymphozyten war in 15 Fällen möglich.

Daher ist dieser Antikörper zur Bestimmung der Leukozytensubpopulationen, insbesondere der Monozyten, hervorragend geeignet.

Die beiden Ejakulatproben, in denen Granulozyten und Lymphozyten nicht deutlich voneinander abgegrenzt werden konnten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Diagramme, die sich aus den flowzytometrischen Messungen dieser Arbeit erstellen lassen, entsprechen weitestgehend der von Diemer T. et al. (1994) erwarteten Verteilung der Leukozytensubpopulationen.

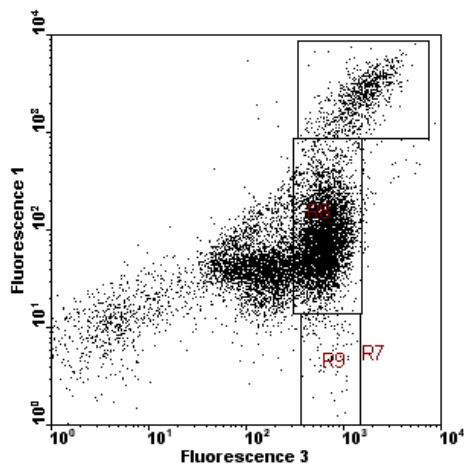


Abb. 4.6: Färbung seminaler Leukozyten mit CD45 (FL3) und CD14 (FL1).

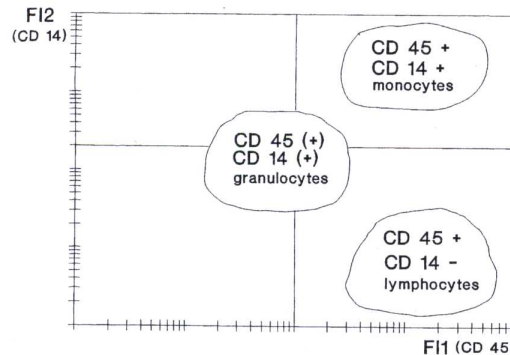


Abb. 4.7: Von Diemer T. et al. (1994) erwartete Anordnung der Leukozytensubpopulationen im Dotplot.

Die Antikörper gegen CD14 zeigen hohe Affinität an Monozyten und niedrigere Bindungskapazität an Granulozyten; Lymphozyten werden von diesen Markern nur schwach gefärbt. Dies entspricht der Beschreibung von Diemer T. et al. (1994). Das Färbeverhalten der seminalen Leukozyten bezüglich des Pan-Leukozytenantikörpers CD45 wurde bereits im Kapitel 4.5.1 erläutert.

Aus dem Ejakulat stammende Lymphozyten weisen eine deutlich geringere Affinität zu diesem Molekül auf als Monozyten. Daher trifft die von Diemer et al. vermutete Lokalisation der Subpopulationen im Dotplot nach Markierung mit CD45 und CD14 besser auf die flowzytometrische Messung peripherer Leukozyten des Blutes zu.

CD14 wurde in einer Studie von Devitt A. et al. (1998) als wichtiger Marker für die Erkennung und anschließender Phagozytose apoptotischer Zellen identifiziert. Zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen findet eine CD14- vermittelte Interaktion statt, ohne eine Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren zu initiieren, wie sie bei der Bindung des LPS/LBP- Komplexes an CD14 beobachtet wird. Auf eine physiologische Weise könnten Spermatozoen so aus dem Urogenitaltrakt entfernt werden, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Auf der anderen Seite wurden Monozyten und den von ihnen sezernierten Substanzen

wie IL-1 oder TNF α (Frungieri M.B. et al., 2002) sowie Stickstoffmetaboliten eine deutlich schädigende Wirkung auf die Qualität des Ejakulates nachgewiesen. Die Frage, ob Monozyten, stellvertretend für alle Leukozyten, eine Rolle bei der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Infertilität spielen, lediglich als harmloser Bestandteil des Ejakulates vorkommen oder bei der Regulation des natürlichen Gleichgewichtes im männlichen Genitaltraktes mitwirken, sollte in Anbetracht der Bedeutung, die diese Erkenntnis für die Infertilitätsdiagnostik und –therapie innehat, dringend in nachfolgenden Studien beantwortet werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung ist in der Lage, eine deutliche Abgrenzung der mononukleären Zellen im Ejakulat zu erreichen und könnte somit weiteren Arbeiten als Hilfsmittel dienen, die Rolle der seminalen Monozyten zu erhellen.

Das Ergebnis verdeutlicht, dass Monozyten mit durchschnittlich 20,3% (10,7-38,8%) als zweitgrösste Leukozytenpopulation nicht unwesentlich zur Gesamtzahl der seminalen Leukozyten beitragen. Mit der momentan in der andrologischen Praxis angewandten Peroxidase- Methode werden diese Zellen nicht angefärbt und deshalb nicht mit in die Beurteilung der Proben einbezogen.

Die Erfassung der Monozyten sollte jedoch nicht ausser acht gelassen werden, wenn es darum geht, ob eine Ejakulatprobe als leukozytospem bezeichnet werden muss oder nicht, solange die Funktion dieser Zellen und die Konsequenzen bezüglich des weiteren Therapiekonzepts nicht eindeutig geklärt sind.

4.5.4 Lymphozytenfärbungen

4.5.4.1 B- Lymphozyten

Da sich der mittlere prozentuale Anteil der Lymphozyten insgesamt in den von uns verwendeten Proben als sehr gering herausstellte (< 5%), gestaltete sich die Auftrennung in die Untergruppen schwierig.

Bei dem Versuch, die B- Lymphozyten mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen CD19 und CD22 nachzuweisen, zeigte sich, dass zwar eine Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten möglich ist, die im Ejakulat vorhandenen Lymphozyten jedoch fast sämtlich sowohl CD19 als auch CD22 negativ sind und somit am ehesten den T- Zellen entsprechen.

Mit Ausnahme von Couture M. et al. (1976) konnten die meisten Autoren, darunter Wolff H. und Anderson D.J. (1988), Aitken R.J. et al. (1994) sowie Tomlinson M.J. et al. (1993) B- Lymphozyten in weniger als der Hälfte der Ejakulate nachweisen. Ausserdem fanden sich insbesondere die B- Lymphozyten und Plasmazellen in nur geringer Zahl.

In einigen wenigen Fällen waren B- Zellen die stärkste Leukozytenpopulation im Ejakulat. Aitken R.J. et al. (1994) konnten dies in 6,6%, d.h. in 6 Ejakulatproben nachweisen. Jedoch war der Grad der Infiltration zu gering, die Schwelle zur Leukozytospemie wurde nicht überschritten.

In der Studie von Wolff H. und Anderson D.J. (1988) zeichneten sich zwei von drei verwendeten B- Zellantikörper durch eine schwache Reaktivität aus. Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper reagierten beide hervorragend mit B- Zellen aus der Blutprobe. Bei den Versuchen zur Markierung seminaler B- Zellen scheint die Schwierigkeit auch nicht an mangelnder Reaktivität der Antikörper zu liegen, sondern doch am ehesten dem Fehlen der B- Lymphozyten zuzuschreiben zu sein. Da sowohl B- Lymphozyten als auch Plasmazellen ortständig sind und sich bevorzugt in den lymphatischen Organen aufhalten, sind sie lediglich zu einem geringen Prozentsatz im Blut und möglicherweise aus dem gleichen Grund auch in kleiner Zahl im männlichen Genitaltrakt nachzuweisen. Marchlewicz M. (2001) und el-Demiry M.I. et al. (1985) fanden keine oder nur wenige B- Zellen in Epididymis und Prostata.

Dazu kommt, dass Plasmazellen, die im Ejakulat für die Produktion von Antikörpern gegen Spermatozoen (ASA) verantwortlich sind (Wolff H., 1995) weder durch CD19 noch durch CD22 identifiziert werden können, da diese Zellen die B- Zelltypischen Oberflächenmarker verloren haben.

4.5.4.2 T-Lymphozyten

Neben den Pan- Leukozytenantikörpern CD45 und CD53 wurde bereits in den Vorversuchen A der gegen T- Lymphozyten gerichtete Marker CD3 eingesetzt. Bei den Leukozyten des peripheren Blutes, die verschiedenen Ejakulaten zugemischt wurden, konnte durch diesen Antikörper eine hervorragende Trennung der CD3 positiven Zellen von den restlichen Leukozyten und anderen Ejakulatbestandteilen erzielt werden.

Überraschenderweise gestaltete sich die Differenzierung der seminalen T- Zellen schwierig. Nur durch das Setzen eines Gates in FSC/SSC in dem Bereich, der die Lymphozyten enthält, und nachfolgende Projektion in FL1/FL3 konnten die durch CD3 und CD45 markierten T- Zellen sichtbar gemacht werden. Ansonsten waren die T- Zellen von der Vielzahl der anderen Partikel im Ejakulat nicht zu differenzieren.

Eine weitere Unterteilung der T- Lymphozyten mittels CD4 und CD8 gelang nicht.

Laut Wolff H. machen die T- Zellen zwar lediglich 2-5% der seminalen Leukozyten aus (1995), sind jedoch in ca. 2/3 der Ejakulate vorhanden (1988).

Dagegen identifizierte Aitken R.J. et al. (1994) die T- Lymphozyten in 62% der Ejakulate. Sie waren zweitgrößte Leukozytenpopulation im Ejakulat, in 4 Proben stellten sie sogar die größte Gruppe. Jedoch war der Grad der Infiltration selbst dort, wo T- Zellen dominierten, zu gering, um die Grenze zur Leukozytospemie zu überschreiten. Einige Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss der B- und T- Lymphozyten auf die Qualität des Ejakulates. Dabei konnten Gil T. et al. (1998) keinen Unterschied in der Lymphozytenzellzahl zwischen fertilen und infertilen Patienten feststellen. Weiterhin sind weder B- noch T- Zellen mit einem der Ejakulatparameter assoziiert. (Tomlinson M.J. et al., 1993)

4.5.4.3 Natürliche Killerzellen

Nachdem Gil T. et al. (1998) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD16 der flowzytometrische Nachweis sogenannter ‚large granular lymphocytes‘ (LGL) im Ejakulat gelang, wurde dieser Marker zusammen mit CD56, einem ebenfalls gegen Natürliche Killerzellen gerichteten Antikörper, in diese Messung aufgenommen. In unseren Messreihen konnten weder unter den Leukozyten des peripheren Blutes noch unter den seminalen Leukozyten die von Gil T. et al. (1998) beschriebenen CD16 positiven Lymphozyten nachgewiesen werden.

Gil T. et al. (1998) bildeten in ihrer Studie drei Patientengruppen: fertile Patienten, Infertilitätspatienten ohne Antispermatozoen- Antikörper (ASA) und Infertilitätspatienten mit ASA. CD16 positive Lymphozyten liessen sich in allen Gruppen ausmachen, jedoch betrug der mittlere prozentuale Anteil in den beiden

ersten Kollektiven jeweils lediglich ca. 2%, bei Infertilitätspatienten mit ASA ca. 10% aller gemessenen Leukozyten. Die Erhöhung der LGL werten die Autoren als Charakteristikum der Ejakulate infertiler Patienten mit ASA und spekulieren, dass LGL möglicherweise immunmodulatorisch wirksam sind und so die ASA Bildung der B- Lymphozyten downregulieren. Folglich könnten im Ejakulat vorhandene ASA zu einer Erhöhung der LGL führen.

Betrachtet man die Dotplots von Gil T. et al. (1998) genauer, zeigt sich in keinem der abgebildeten Diagramme eine deutliche Grenze zwischen CD16 positiven und CD16 negativen Zellen. Lediglich in der dritten Gruppe sind Zellen dargestellt, die deutlich CD16 positiv sind, jedoch ist auch hier die von den Autoren gezogene Trennlinie zwischen positiv und negativ markierten Zellen eher willkürlich.

Weiterhin unterscheidet sich das Ergebnis der Studie auch insofern von anderen Untersuchungen, dass, wie oben bereits erwähnt, Monozyten in allen Ejakulaten als vorherrschende Leukozytenpopulation auftraten.

Auch Thaler C.J. et al. (1994) gelang durch Markierung mit monoklonalen Antikörpern die flowzytometrische Bestimmung von Leukozyten, die den Oberflächenmarker CD16 tragen. Sie stellten fest, dass nach Inkubation von Lymphozyten des peripheren Blutes mit Seminalplasma der prozentuale Anteil von CD16 positiven Zellen signifikant anstieg. Sie schlossen aus ihren Experimenten, dass dieser Anstieg in der Gruppe der CD56 positiven natürlichen Killerzellen durch den Einfluss einer aus dem Sekret der Prostata stammenden Komponente des Seminalplasmas hervorgerufen wurde, die die Freisetzung des Oberflächenmarkers aus intrazellulären Pools bewirkt. Allerdings konnte weder die im Prostatasekret enthaltene Substanz identifiziert, noch die intrazelluläre Lokalisation von CD16 nachgewiesen werden.

Somit wäre auch eine andere Erklärung für den erhöhten Anteil CD16 positiver Zellen zu erwägen: Seminalplasma enthält eine lösliche Form dieser antigenen Struktur. Somit könnten die zugemischten Zellen des peripheren Blutes diesen Marker aus dem Seminalplasma aufnehmen, ein Prozess, der in ähnlicher Weise für die Aufnahme des Membranproteins CD13 durch Spermatozoen beschrieben wurde (Arienti G. et al., 1997).

Bukovsky A. et al. (1991) fanden mit dem Nachweis von löslichem CD16 in den Epithelzellen von Prostata und Samenblasen sowie in deren Sekreten eine mögliche Quelle der löslichen Form dieses Antigens. Man kann nun spekulieren, ob die von Thaler C.J. et al. (1994) im Prostatasekret gesuchte Substanz, die zur Erhöhung CD16 positiver Zellen führt, vielleicht der löslichen Form von CD16 entspricht.

Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um Thaler C.J. (1994) individuelle Unterschiede bezüglich des Anstiegs der CD16 positiven Zellen nach Inkubation mit Seminalplasma verzeichnen. Ebenso wurde von Sedor J. et al. (1993) individuelle Unterschiede in der Konzentration von löslichem CD16 im Seminalplasma beschrieben, die die Autoren am ehesten auf sterische Interferenzen zurückführen. Ist in einigen Ejakulaten die Konzentration von löslichem CD16 höher als bei anderen, könnte diese antigene Struktur in solchen Ejakulaten stärker von Zellen aufgenommen werden.

Um die aufgestellte Hypothese zu prüfen, müsste die Konzentration des löslichen CD16 im Seminalplasma vor und nach Zugabe von peripheren Leukozyten bestimmt werden.

Im Gegensatz zu Gil T. et al. (1998) fügten Thaler C.J. et al. (1994) Leukozyten des peripheren Blutes dem Seminalplasma bei und beobachteten dessen Wirkung auf die Zellen. Somit gibt diese Studie keinen Hinweis darauf, ob Natürliche Killerzellen/ LGL unter den seminalen Leukozyten zu finden sind.

Der Nachweis der seminalen CD16- positiven Zellen von Gil T. et al. (1998) bleibt einzig in der Literatur und konnte von den Messungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nach WHO Richtlinien wird bei jeder Ejakulatanalyse die Zahl der seminalen Leukozyten bestimmt, da diese bei Überschreitung der Norm Hinweis auf eine Entzündung des Genitaltraktes geben können.

In dieser Arbeit werden mehrere Antikörper, die der Erfassung und Differenzierung der Leukozyten sowie deren Aktivierungsgrades dienen, auf ihre Eignung zur Anwendung im Ejakulat überprüft. Das flowzytometrische Ergebnis seminaler Leukozyten wird mit dem peripherer Leukozyten verglichen. Zudem soll eine alternative Methode zur Leukozytenbestimmung im Ejakulat vorgestellt werden, die im Gegensatz zur Peroxidasemethode nicht nur die seminalen Granulozyten erfasst.

Dazu wurden in einer Versuchsreihe 10 fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper an 21 leukozytospermien Ejakulaten mittels Flowzytometrie erprobt. Zuvor waren Methoden zur Aufreinigung der Ejakulate und Aufbewahrung der gefärbten Proben getestet worden.

Mit Ausnahme von CD16/ CD56, den beiden gegen Natürliche Killerzellen gerichteten Antikörpern, eignen sich die ausgewählten Marker wie erwartet hervorragend, um die Subpopulationen der Leukozyten im Blut flowzytometrisch darzustellen.

Bei den Ejakulatproben waren lediglich die beiden Pan- Leukozyten- Antikörper (CD45/ CD53) und der Monozytenmarker CD14 in der Lage, eine ausreichende Differenzierung der Leukozyten zu ermöglichen. Die Färbung der Leukozyten mittels Granulozytenmarker schien durch Kreuzreaktivität mit anderen Ejakulatbestandteilen beeinflusst, Lymphozyten konnten aufgrund des geringen Anteils an den seminalen Leukozyten nicht weiter in B- und T- Zellen unterteilt werden. Eine Unterscheidung von aktivierten und ruhenden Leukozyten mit Hilfe von Aktivitätsmarkern (CD69/ CD71) konnte nicht getroffen werden.

Wie bereits in der Literatur beschrieben zeigen auch diese Messungen einheitlich ein Überwiegen der Granulozyten (70-75%) im Ejakulat, gefolgt von Monozyten mit 20-25% als zweitgrösster Leukozytensubpopulation. Seminale Lymphozyten sind nur in geringer Zahl nachweisbar (3-4%).

Die flowzytometrische Differenzierung der Leukozyten ist im Ejakulat also ungleich schwieriger durchzuführen als im Blut. Wie das Ergebnis dieser Arbeit verdeutlicht sind nicht alle monoklonalen Antikörper zur Verwendung im Ejakulat geeignet.

Literaturverzeichnis

- Abbas K.A. et al. (1996):** Immunologie. Verlag Hans Huber: 81/83
- Agrawal Y.P. et al. (1991):** Use of quality control standards in clinical flow cytometry. *Annals of Medicine* 23: 127-133.
- Aitken R.J. et al. (1994):** Leukocytic infiltration into human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *Journal of Andrology* 15(4):343-352
- Aitken R.J., Baker H.W.G. (1995):** Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Human Reproduction* 10(7): 1736-1739.
- Alam R., Gorska M. (2003):** The immune system. 3. Lymphocytes. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 111(2 Suppl): 476-478.
- Alexander D.R. (2000):** The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin. Immunol.* 12(4): 349-359.
- Alvarez J.G. et al. (2002):** Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility* 78:319-329.
- Angelisova P. et al. (1990):** The human leucocyte surface antigen CD53 is a protein structurally similar to the CD37 and MRC OX-44 antigens. *Immunogenetics.* 32(4): 281-285.
- Arata de Bellarbarba G. et al. (2000):** Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Andrology* 45(3): 131-136
- Arendt C.W., Ostergaard H.L. (1997):** Identification of the CD45-associated 116-kDa and 80-kDa proteins as the α - and β -subunits of α -glucosidase II. *J. Biol. Chem.* 272(20): 13117-13125.
- Arienti G. et al. (1997):** Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta.* 1336(3): 533-538.
- Armstrong J.S. et al. (2002):** A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. *International Journal of Andrology* 25(4):223- 229.
- Ashmun R.A., Look A.T. (1990):** Metalloprotease activity of CD13/ Aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood* 75(2): 462-469.
- Baker M.A. et al.(2003):** Biochemical entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. *Protoplasma* 221, 145-151.
- Barratt C.L. et al. (1991):** Seminal white blood cells in men with urethral tract infection. A monoclonal antibody study. *British Journal of Urology* 68: 531-536.
- Bhagwat S.V. et al. (2001):** CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97(3): 652-659.
- Borish L.C., Steineke J.W. (2003):** The immune system. 2. Cytokines and chemokines. *Journal Allergy Clin Immunology* 111: 460-475.
- Braun R.K. et al. (2003):** Differential regulation of aminopeptidase N (CD13) by transendothelial migration and cytokines on human eosinophils. *Exp. Lung Res.* 29(2): 59-77.
- Bukovsky A. et al. (1991):** Antigens of immunoglobulin G-Fc receptor III in human male reproductive tract accessory glands. *Fertility and Sterility* 55(3): 595-602.
- Burmester G.R., Pezzutio A. (1998):** Taschenatlas der Immunologie, Thieme: 74/75; 78/79

- Chaplin D.D. (2003):** The immune system. 1. Overview of the immune response. *Journal of Allergy Clin Immunology* 111: 442-459.
- Chen J. et al. (2004):** CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat. Immunol.* 5(6): 651-657.
- Cherukuri A. et al. (2004):** The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *Journal of Immunology*, 172: 370-380.
- Close C.E., Roberts P.L. (1990):** Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *Journal of Urology* 1990; 144:900-903.
- Collins B.E. et al. (2004):** Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(16): 6104-6109.
- Compton T. et al. (2003):** Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of Virology* 77(8): 4588-4596.
- Couture M. et al. (1976):** Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia* 1976; 8:61-68
- Curnis F. et al. (2002):** Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Research* 62(3): 867-874.
- Dallaire M.J. et al. (2003):** Endothelial cells modulate eosinophil surface markers and mediator release. *Eur. Respir. Journal.*; 21(6):918-924.
- D'Cruz O.J. et al. (1997):** Expression of CD15 (Lewisx) antigen on human sperm and its role in sperm- egg interaction. *American Journal Reprod Immunology* 37(2): 172- 183.
- De Geyter C. et al. (1994):** Peroxidase- positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotics treatment adversely influence the outcome of in- vitro- fertilization and embryo transfer. *International Journal of Andrology* 17:127-134.
- De Maria R. et al. (1994):** Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J. Exp. Med.* 180(5): 1999-2004.
- Delves P.J., Roitt I.M. (1998):** *Encyclopedia of Immunology*, vol 2, 2nd edn, Academic Press: 932-947.
- Devitt A. et al. (1998):** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392(6675): 505-509.
- Diemer T. et al. (1994):** Percoll density gradient centrifugation and consecutive flow cytometry do not identify leukocytes and leukocyte subtypes in ejaculate specimens. *Andrologia* 26: 93-96.
- Do S.I. et al. (1990):** Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 265(1):114-125.
- Eggert- Kruse W. et al. (1992):** Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertility and Sterility* 58:1046-1055
- Eggert- Kruse W. et al. (2001):** Relationship of seminal plasma interleukin (IL) –8 and IL-6 with semen quality. *Human Reproduction* 16(3): 517-528.
- el- Demiry M.I. et al. (1985):** Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *British Journal of Urology* 57(6): 769-774.

- el-Demiry M.I. et al. (1986):** Leucocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. *British Journal of Urology* 58:715-720
- Engering A., Pieters J. (2001):** Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *International Immunology* 13(2): 127-134.
- Erel C.T. et al. (1997):** Antibiotic therapy in men with leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med.* 42(3): 206-210.
- Erenpreiss J. et al.(2002):** Effect of Leukocytospermia on Sperm DNA Integrity: A Negative Effect in Abnormal Semen Samples. *J Andrology* 23:717-723.
- Ferrara F. et al. (1997):** Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clinical Chemistry* 43(5):801-807.
- Fichorova R.N. et al. (2002):** Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *Journal of Immunology* 168: 2424-2432.
- Filipp D. et al. (2001):** Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Immunology* 98(2): 603-608.
- Fraczek M. et al. (2004):** Interaction between leucocytes and human spermatozoa influencing reactive oxygen intermediates release. *International Journal of Andrology* 27:69-75.
- Friebe K. et al. (2003):** Levels of interleukin-6 and interleukin-8 in seminal fluid of men attending an andrological clinic. *Andrologia* 35(2): 126-129.
- Frungieri M.B. et al. (2002):** Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertility and Sterility* 78(2): 298-306
- Fujimoto M. et al. (1999):** Modulation of B Lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD 19/ CD 22 regulatory loop. *Immunity* 1999 Aug Vol 11, 191-200
- Fujimoto M. et al. (2002):** Complementary roles for CD19 and Bruton's Tyrosine kinase in B lymphocyte signal transduction. *Journal of Immunology*, 168:5465-5476.
- Funke B. et al. (2004):** Immunological evaluation of the new stable ultrasound contrast agent LK 565: a phase one clinical trial. *Cardiovascular ultrasound*; 2(1): 16
- Gemsa D. et al. (1997):** *Immunologie: Grundlagen- Klinik- Praxis.* 4. Auflage, Thieme Verlag
- Gil T. et al. (1995):** CD4+ cells in human ejaculates. *Human Reproduction* 10: 2923-2927
- Gil T. et al. (1998):** Increase of large granular lymphocytes in human ejaculate containing antisperm antibodies. *Human Reproduction* 13:296-301
- Griveau J.F. et al. (1994):** An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *International Journal of Andrology* 17(6): 300-307.
- Gupta D. et al. (1996):** CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 271(38): 23310-23316
- Hacker-Klom U.B. et al. (1999):** DNA flow cytometry of human semen. *Human Reproduction* 14(10): 2506-2512.
- Hailman E. et al. (1994):** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179(1): 269-277.
- Hale G. et al. (1993):** The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 23(2): 189-205.

- Han K. et al. (1999):** Human basophils express CD22 without expression of CD19. *Cytometry*, 37(3): 178-183.
- Hancock W.W. et al. (1982):** A comparison of fixatives and immunohistochemical techniques for use with monoclonal antibodies to cell surface antigens. *Am J Clin Pathol* 78(6): 825-831.
- Harris C.L. et al. (2001):** The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa. *Immunology* 104:317-323.
- Harrison D. et al. (1991):** Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* 147(10): 3459-3465.
- Hashida H. et al. (2002):** Amino-peptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122(2): 376-386
- Hastka (1997):** *Immunzytologie*. Schattauer: 39-42
- Henkel R., Schill W.B. (1998):** Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* 30 (Supp.1): 91-97
- Henkel R. et al. (2003):** Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia* 35(5) 309-313.
- Herminston M.L. et al. (2002):** Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J. Clin. Invest.* 109(1): 9-14.
- Herminston M.L. et al. (2003):** CD45 : a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 107-137.
- Hernandez-Torres J. et al. (2001):** Differential cooperation between regulatory sequences required for human CD53 gene expression. *J. Biol. Chem.* 276(38): 35405-35413.
- Hsu P.C. et al. (1999):** Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology*. 139(1-2): 93-101.
- Huang K. et al. (1997):** Alanine aminopeptidase from human seminal plasma : purification, characterization, and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J Biochem (Tokyo)*. 122(4): 779-787.
- Huschak G. et al. (2003):** Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin. Exp. Immunology* 134(3): 491-496.
- Janeway C.A. et al. (2001):** *Immunobiology*. 5th edition, Garland Publishing, NY.
- Janeway C.A. et al. (2002):** *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Justement L.B. (2001):** The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of lymphocyte activation. *Int. Rev. Immunol.* 20(6): 713-738.
- Kaleli S. et al. (2000):** Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstetrics Gynecology and Reprod Biology* 89: 185-191.
- Kanayasu-Toyoda T. et al. (1999):** Commitment of neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells coincides with expression of transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* 274(36): 25471-25480.
- Keer H.N. et al. (1990):** Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *Journal of Urology* 143(2): 381-385.

Kehlen A. et al. (2003): Biological significance of aminopeptidase N/ CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Research* 63: 8500-8506.

Kenji T. et al. (2000): CD13/ aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161(5): 1636-1642.

Kiessling A.A. et al. (1995): Semen leukocytes: friends or foes? *Fertility and Sterility* 64(1):196-198.

Krause W., Weidner W. (1998): *Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane.* 3. Auflage, Enke Verlag.

Krause W. et al. (2002): Are viral infections the cause of leukocytospermia? *Andrologia* 34: 87-90.

Krause W. et al. (2003): Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. *Andrologia* 35: 279-282.

Kuhn L.C. (1989): The transferrin receptor: a key function in iron metabolism. *Schweiz Med Wochenschr.* 119(39):1319-1326.

Labeta M.O. et al. (2000): Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *Journal of Experimental Medicine* 191(10):1807-1812.

Lanier L.L. et al. (1989): Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 169: 2233-2238.

Lanier L.L. et al. (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.* 146(12): 4421-4426.

Ledbetter J.A. et al. (1988): CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8628-8632.

Lohn M. et al. (2002): Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk. Lymphoma* 43(2): 407-413.

Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y. (1992): Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 267(30): 21551-21557.

Longobardi Givan A (1992): *Flow Cytometry: First Principles.* Wiley-Liss Verlag: 15-40.

Maecker H.T. et al. (1997): The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal* 11(6): 428-442.

Mahadevan D., Saldanha J.W. (1999): The extracellular regions of PSMA and the transferrin receptor contain an aminopeptidase domain: implications for drug design. *Protein Science* 8(11): 2546-2549.

Makler A. et al. (1998): Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of high-density Percoll gradients. *Fertility and Sterility* 70(5): 961-966.

Marchlewicz M. (2001): Localization of immunocompetent cells in the human epididymis. *Folia Histochem Cytobiol.* 39(2):173-174.

Marzio R. et al. (1999): CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21(3): 565-582.

Melaine N. et al. (2003): Experimental inoculation of the adult rat testis with Sendai virus: effect on testicular morphology and leukocyte population. *Human Reproduction* 18(8): 1574-1579.

- Michelmann H.W. (1998):** Influence of bacteria and leukocytes on the outcome of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Andrologia* 30(Supp.1): 99-101
- Mollinedo F. et al. (1997):** Recurrent infectious diseases in human CD53 deficiency. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4(2): 229-231.
- Montag M. et al. (1999):** Recovery of ejaculated spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection after anti-inflammatory treatment of an azoospermic patient with genital tract infection : a case report. *Andrologia* 31(1):179-181.
- Mori E. et al. (2000):** Calcium ion- independent recognition of sialyl and nonsialyl N-acetylactosamine and Le(x) structures by boar sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 374(1): 86-92.
- Mori T. et al. (2000):** Molecular and immunological approaches to mammalian fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 47(2): 139-158.
- Moser P.L. et al. (2002):** Correlation between inflammatory cells (T and B lymphocytes, macrophages) in prostate biopsies and elevated PSA levels in a PSA screening population. *Urology* 59(1):68-72.
- Nakayama F. et al. (2001):** CD15 expression in mature granulocytes is determined by α 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by α 1,3-fucosyltransferase IV. *J. Biol. Chem.* 276(19): 16100-16106.
- Ned R.M. et al. (2003):** Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood* 102(10): 3711-3718.
- Nopp A. et al. (2002):** Quantitative, rather than qualitative, differences in CD69 upregulation in human blood eosinophils upon activation with selected stimuli. *Allergy* 55(2): 148-156.
- Novocastra Laboratories Produktkatalog 2003/2004.**
- Novotny J., Oborna I. (2003):** The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. *Biomed Papers* 147(2): 173- 176.
- Ochsendorf F.R.(1998):** Infection and reactive oxygen species. *Andrologia* 30(Supp.1): 81-86
- Okada H. et al. (1993):** Subpopulation of leukocytes in the semen from fertile and infertile men—immunohistochemical and flow-cytometric analysis. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1993 Feb 84(2):350-354.
- Ormerod M.G. (1994):** *Flow Cytometry: A Practical Approach*, 2nd edn, Oxford University Press: 1-25.
- Otero D.C., Rickert R.C. (2003):** CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *Journal of Immunology* 171: 5921-5930.
- Paganuzzi M. et al. (2003):** Prognostic role of serum sialyl Lewis^x (CD15s) in colorectal cancer. *Oncology* 65: 52-59.
- Pan Z. et al. (2000):** Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J. Biol. Chem.* 275(46): 36430-36435.
- Pasqualotto F.F. et al. (2000):** Relationship between oxidative stress, semen characteristics, an clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and Sterility* 73:459-464.
- Penninger J.M. et al. (2001):** CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol.* 2(5): 389-396.

- Pezzutto A. et al. (1988):** Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti- immunoglobulin. *J. Immunol.* 140(6): 1791-1795.
- Ponka P., Lok C.N. (1999):** The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(10): 1111-1137.
- Poussin C. et al. (1998):** CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. *Biol. Chem* 273(32): 20285-20291.
- Prussin C., Metcalfe D.D. (2003):** The immune system. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*(2 Suppl): 486-494
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (1994).** 257. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin.
- Puls K.L. et al. (2002):** CD53, a thymocyte selection marker whose induction requires a lower affinity TCR-MHC interaction than CD69, but is up-regulated with slower kinetics. *International Immunology* 14(3): 249-258.
- Punab M. et al. (2003):** The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint, *Andrologia*, 2003, Oct, 35(5):271-8
- Raffael A. (1988):** Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie: Analytical Flow Cytometry - Basics and Principles
- Rauch U. et al. (2003):** Leukocyte CD15 expression and platelet activation in the coronary sinus after coronary intervention. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33:109-115.
- Ricci G. et al. (2000):** Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Human Reproduction* 15(6): 1329-1337.
- Riemann D. et al. (1999):** CD13- not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today* 20(2): 83-88.
- Rodin D.M. et al. (2003):** Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertility and Sterility* 79(3):1555-1558
- Roitt I.M. et al.(1995):** Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage, Thieme Verlag.
- Saleh R.A. et al. (2002a):** Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78: 313-318
- Saleh R.A. et al. (2002b):** Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility Sterility* 78(6): 1215-1224.
- Sancho D. et al. (2005):** CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26(3): 136-140.
- Sathish J.G. et al. (2004):** CD22 is a functional ligand for SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in primary T cells. *J. Biol. Chem.* 279(46): 47783-47791.
- Schwartz- Albiez R. et al. (1991):** CD22 antigen: biosynthesis, glycosylation and surface expression of a B lymphocyte protein involved in B cell activation and adhesion. *Int Immunol.* 3(7): 623-633.
- Sedor J. et al. (1993):** Soluble Fc gamma RIII (CD16) and immunoglobulin G levels in seminal plasma of men with immunological infertility. *Journal of Andrology* 14(3): 187-193.
- Shimoya K. et al. (1993):** Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertility and Sterility* 59(4):885-888.

Sikka S.C. (2001): Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 8(7): 851-862.

Simbini T., Umapathy E. (1998): Study on the origin of seminal leukocytes using split ejaculate technique and the effect of leucocytospermia on sperm characteristics. *Urol Int* 61(2):95-100

Spertini F. et al. (2004): Epitope-specific crosslinking of CD45 down-regulates membrane-associated tyrosine phosphatase activity and triggers early signalling events in human activated T cells. *Immunology* 113(4): 441-452.

Tedder T.F. et al. (2000): CD 19 and CD22 regulate a B lymphocyte signal transduction pathway that contributes to autoimmunity. *Keio J med.* 2000 Mar; 49(1):1-13

Testi R. et al. (1990): CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J. Exp. Med.*; 172(3): 701-707.

Thaler C.J. et al. (1994): Increase of lymphocytes expressing Fc receptor class III (CD 16) by exposure to human seminal plasma. *Fertility and Sterility* 61:151-159

Tomlinson M.J. et al. (1993): Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility* 60:1069-1075

Tortolero I. et al. (2004): The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. *Arch Esp Urol.* 2004 57(9):921-928

Trabulsi E.J. et al. (2002): Leukocyte subtypes in electroejaculates of spinal cord injured men. *Arch Phys Med Rehabil* 83(1): 31-34

Trummer H. et al. (2002): The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reproduction* 17(6): 1554-1559.

Uciechowski P. et al. (1992): Fc gamma RIII activation is different in CD16+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 22(6): 1635-1638.

Uehara A. et al. (2003): Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10(2): 286-292.

Vannelli B.G. et al. (1986): Immunostaining of transferrin and transferrin receptor in human seminiferous tubules. *Fertility and Sterility* 45(4): 536-541.

Vernet P. et al. (2001): Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65:1102-1113

Vicari E. (1999): Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Human Reproduction* 14(8) 2025-2030

Villegas J. et al. (2002): Indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies for the detection of leukocytospermia: comparison with peroxidase staining. *Andrologia* 34, 69-73

Wallace V.A. et al. (1992): CD45RA and CD45RB expression induced by thymic selection events. *J. Exp. Med.* 176:1657-1663.

Walsh G.M. et al. (1996): Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*; 87(7):2815-2821.

Wang Y. et al. (2002): The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines. *Immunity* 17(4): 501-514.

Weidner W. et al. (1998): Therapy in male accessory gland infection – what is fact, what is fiction? *Andrologia* 30(Supp.1): 87-90.

- Weissman A.M. et al. (1988):** Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor ζ chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci* 85: 9709-9713.
- WHO Laborhandbuch** zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim- Interaktion. 4. Auflage, 1999, Springer Verlag
- Wolff H., Anderson D.J. (1988):** Immunhistologic characterization and quantitation of leucocyte subpopulations in human semen. *Fertility and Sterility* 49: 497-504.
- Wolff H. et al. (1990):** Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertility and Sterility* 53:528-536.
- Wolff H. (1995):** The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility* 63:1143-1157.
- Wolff H. (1998):** Methods for the detection of male genital tract inflammation. *Andrologia* 30(Supp.1): 35-39.
- Yakirevich E. et al. (2002):** Cytotoxic phenotype of intra- epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Human Reproduction* 17(2): 275-283.
- Yanushpolsky E.H. et al. (1995):** Antibiotic therapy and leukocytospermia: a prospective, randomized, controlled study. *Fertility and Sterility* 63:142-147.
- Yanushpolsky E.H. et al. (1996):** Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertility and Sterility* 66:822-825
- Yoshimura C. et al. (2002):** Activation markers of human basophils : CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109(5): 817-823.
- Yoshitani N. et al. (2001):** Detection of carbohydrate recognition molecules on the plasma membrane of boar sperm by dextran-based multivalent oligosaccharide probes. *Glycobiology* 11(4): 313-320.
- Yunta M. et al. (2002):** Transient activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity by ligation of the tetraspan CD53 antigen in different cell types. *Eur. J. Biochem.* 269: 1012-1021.
- Zalata A. et al. (1996):** The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Human Reproduction* 11(4): 761-764.
- Zhou L.J. et al. (1991):** Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *Journal of Immunology*, 147(4): 1424-1432.
- Ziegler- Heitbrock H.W. et al. (1994):** CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 24(8): 1937-1940.
- Zinaman M.J. et al. (2000):** Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J. Androl.* 21(1):145-153
- Ziyyat A. et al.(1999):** Flow cytometry isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction characterization of human round spermatids in infertile patients. *Human Reproduction*, 14(2): 379-387.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADC	analog to digital converter
ASA	antisperm antibodies
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie- Virus
DNS	Desoxyribunocleinsäure
Evtl.	Eventuell
FACS	fluorescence activated cellsorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward scatter
GM- CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPI	glycosyl phosphatidyl inositol
HIV	human immunodeficiency Virus
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
IVF	in vitro Fertilisierung
kDa	Kilodalton
LBP	LPS- binding protein
LGL	large granular lymphocyte
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
NK	Natürliche Killerzellen
PAF	platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
RNA	ribonucleid acid
ROS	reactive oxygen species
SPM	sperm preparation medium
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
TC	Tricolor
TCR	T- cell receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WBC	white blood cells

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Alexandra Güth
Adresse:	Neue Strasse 6 56479 Westernohe
Geburtsdatum:	13.12.1976
Geburtsort:	Hadamar
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Deutsch

Schulische Ausbildung:

1983-87:	Grundschule Oberrod
1987-89:	Realschule Rennerod
1989-96:	Konrad-Adenauer-Gymnasium Westerburg
6/96:	Abitur

Hochschulbildung:

10/1996-9/1997:	Studium Anglistik und Biologie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
9/1997-10/2002:	Studium Humanmedizin, Philipps-Universität, Marburg
• 9/1999:	Ärztliche Vorprüfung
• 9/2000:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
• 10/2002:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-11/2003:	Studium Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Giessen
• 11/2003:	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

seit 2001:	experimentelle Arbeit im Labor der Andrologischen Klinik der Universität Marburg Thema: „Flowzytometrische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen im menschlichen Ejakulat“
------------	--

Ärztliche Tätigkeit:

3/2004-2/2005	Assistenzärztin Gynäkologie/ Geburtshilfe, KSSW Wolhusen, Schweiz
Seit 4/2005	Assistenzärztin Gynäkologie/ Geburtshilfe, St. Marienkrankenhaus, Siegen

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Behr, Berger, Bertalanffy, Biens, Cetin, Daut, Eilers, Engehart- Cabillic, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Gofmann, Kern, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Lill, Löffler, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdarf, Müller R., Müller U., Neubauer, Oertel, Rehder, Remschmidt, Renz, Röhn, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulze, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Steiniger, Vogelmeier, Weihe, Werner

in Limburg

Brodersen, Heuschen, Obermaier, Neuss

in Luzern

Schüssler

Danksagung

Ich möchte allen sehr herzlich danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jan Skrzypek für die Einarbeitung sowie die engagierte Betreuung während der gesamten Arbeit- und für die vielen aufmunternden Worte.

Ebenso möchte ich Prof. Krause ein herzliches Dankeschön aussprechen für die Bereitstellung des Themas, das Interesse an meinen Ergebnissen und nicht zuletzt für die zügige Durchsicht der Arbeit.

Für das angenehme Arbeitsklima und Hilfestellung bei vielen Problemen sei vor allem Frau Leinweber gedankt, stellvertretend für alle Mitarbeiterinnen des andrologischen Labors.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Hartmann bedanken für die interessanten Gespräche während meiner zahlreichen Stunden am Flowzytometer, Herrn W. Schmitt von der Firma Leica, ohne den niemals solch schöne fluoreszenzmikroskopische Fotos entstanden wären und Frau Dr. N. Stumpp, Firma Medac, für die Bereitstellung von Literatur.

Nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde für die seelische und moralische Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit sowie meinem Bruder Sebastian für die Hilfe bei computertechnischen Problemen.